



INSTITUTO  
SUPERIOR DE  
AGRONOMIA  
*Universidade de Lisboa*

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária  
Instituto Superior de Agronomia

MUTAÇÕES NO GENE DA MIOSTATINA NA RAÇA BOVINA LIMOUSINE

ANA MARGARIDA FIGUEIREDO GADANHO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor João Pedro Bengala Freire  
Doutor Luís Lavadinho Telo da Gama  
Doutor Rui José Branquinho Bessa  
Doutor Renato Nuno Pimentel Carolino

ORIENTADOR

Doutor Renato Nuno Pimentel Carolino

CO-ORIENTADOR

Doutor José Pedro da Costa Cardoso Lemos

2014

LISBOA

---





INSTITUTO  
SUPERIOR DE  
AGRONOMIA  
*Universidade de Lisboa*

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária  
Instituto Superior de Agronomia

MUTAÇÕES NO GENE DA MIOSTATINA NA RAÇA BOVINA LIMOUSINE

ANA MARGARIDA FIGUEIREDO GADANHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA / PRODUÇÃO ANIMAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor João Pedro Bengala Freire  
Doutor Luís Lavadinho Telo da Gama  
Doutor Rui José Branquinho Bessa  
Doutor Renato Nuno Pimentel Carolino

ORIENTADOR

Doutor Renato Nuno Pimentel Carolino

CO-ORIENTADOR

Doutor José Pedro da Costa Cardoso Lemos

2014

LISBOA

---

*Aos meus pais*

## **Agradecimentos**

À Professora Luísa Falcão, minha professora de licenciatura e de mestrado no Instituto Superior de Agronomia (ISA), por me ter indicado os primeiros passos para a realização desta dissertação.

Ao Professor José Pedro Cardoso Lemos, meu coorientador, pela disponibilidade, interesse, e empenho demonstrado e pela preciosa ajuda que me facultou em momentos mais difíceis.

Ao Professor Nuno Carolino, meu orientador, por toda a sua disponibilidade, paciência, interesse e transmissão de conhecimentos, sem os quais não seria possível o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho.

À Engenheira Inês Carolino, que me ensinou todos os procedimentos para que a vertente prática deste trabalho pudesse ser realizada, bem como outros conhecimentos que me foi transmitindo ao longo das muitas horas de laboratório. O meu muito obrigada também pela paciência infinita que demonstrou, principalmente nos primeiros dias.

À Associação Portuguesa de Criadores de Bovinos da Raça Limousine (ACL) pela disponibilidade que demonstraram autorizando a minha participação neste trabalho e por toda a informação concedida ao longo do estudo.

A todos os criadores de bovinos da raça Limousine que indiretamente contribuíram disponibilizando os seus animais.

A todos os Funcionários, Engenheiros e Doutores que comigo conviveram ao longo deste trabalho na Estação Zootécnica Nacional – Quinta da Fonte Boa, pelo incentivo e disponibilidade demonstrados. À D. Esperança, auxiliar no Laboratório de Genética Molecular, da Unidade de Estratégica Biotecnologia e Recursos Genéticos, que muito me ajudou nas tarefas laboratoriais um agradecimento muito especial

À minha família e amigos, em especial aos meus pais, pela ajuda, apoio, paciência e disponibilidade que tiveram comigo. A todos o meu muito obrigado.

## Mutações no gene da miostatina na raça bovina Limousine

### Resumo:

O objectivo deste estudo foi identificar algumas mutações no gene da miostatina (*Fator de Crescimento Diferencial – 8, GDF-8*) em bovinos da raça Limousine. Este estudo envolveu 82 animais inscritos no Livro Genealógico da raça Limousine, que atualmente pertencem a criadores com explorações em Portugal. A identificação dos polimorfismos foi realizada em oito mutações, entre as quais a mutação específica da raça limousine (F94L), a nt414, nt419, Q204X, E226X, nt821, E291X e C313Y. Os resultados revelaram que 68 dos 82 animais estudados são homozigotos (83%) para a mutação F94L e que 8 dos 10 animais heterozigotos (80%) para esta mutação apresentam uma associação com o genótipo heterozigoto da mutação nt821. Observou-se um animal heterozigoto na mutação nt414 e homozigoto para a F94L e um outro animal heterozigoto para as três mutações, nt414, F94L e Q204X. Os resultados da análise estatística para avaliar o efeito das mutações F94L e nt821 nos caracteres de crescimento e de conformação, obtidos a partir do controlo de performance, demonstram que estas mutações não têm uma influência significativa ( $P>0,05$ ), à excepção da mutação nt821 que influenciou significativamente ( $P<0,05$ ) a aptidão funcional e apresentou um resultado próximo da significância para o desenvolvimento muscular (0,057).

**Palavras-chave:** miostatina, F94L, polimorfismo, genótipo, raça bovina Limousine.

## Miostatin gene mutation in Limousine cattle breed

### **Abstract:**

The objective of this study was to identify some miostatin gene mutations (*Differential Growth Factor – 8, GDF-8*) in Limousine cattle. This study was carried out on 82 animals which are registered in the Limousine Herd Book and are currently the property of Portuguese breeders. Polymorphism identification was carried out in the following eight mutations: the specific mutation for the Limousine breed (F94L), nt414, nt419, Q204X, E226X, nt821, E291X and C313Y. Results showed that 68 of the 82 animals studied are homozygotes (83%) for the F94L mutation and that 8 of the 10 heterozygote animals (80%) for this mutation show an association with the heterozygote genotype of the nt821 mutation. Observation showed a heterozygote animal for mutation nt414, a homozygote animal for F94L and another heterozygote animal for mutations nt414, F94L and Q204X. Statistical analyses were carried out to evaluate the effect of F94L and nt821 mutations on growth and body conformation traits which were obtained from performance control. Results show that these mutations do not have a significant influence ( $P>0,05$ ). However, an exception is seen regarding mutation nt821, which significantly influenced ( $P<0,05$ ) functional capacity and showed an almost significant result on muscular development (0,057).

**Key words:** miostatin, F94L, polymorphism, genotype, Limousin cattle breed

# Índice Geral

I. Introdução	1
II. Revisão bibliográfica	2
II.1. Raça Limousine	2
II.1.1. A história dos bovinos da raça Limousine	2
II.1.2 Características da Raça	3
II.1.3 Aptidão dos bovinos da raça Limousine	6
II.1.4 A raça em Portugal	7
II.1.5 Esquema de Seleção	7
II.1.6 A raça no Mundo	10
II.2. Métodos de seleção	11
II.3. Marcadores Genéticos	13
II.4. Miogénese	15
II.5. Gene da Miostatina	17
II.5.1 Historia	17
II.5.2 Localização e função biológica	18
II.5.3 Duplo Músculo	19
II.5.4 Mutações nas diferentes raças.	21
II.5.5 A mutação do limousine – F94L	23
III. Material e Métodos	25
III.1. Animais	25
III.2. Análise Laboratorial	26
III.2.1 Material Biológico	28
III.2.2 Extração de ADN	28
III.2.3 Reação de amplificação dos fragmentos do gene da miostatina através da técnica de <i>PCR</i>	29
III.2.4 Preparação e Execução da reação <i>PCR</i>	30
III.2.5 Confirmação da amplificação dos fragmentos, produto <i>PCR</i> , por eletroforese em gel de agarose	33
III.2.6 Purificação do produto <i>PCR</i> com <i>ExoSap</i>	33
III.2.7 Adição de <i>ddNTPs</i> marcados por fluorescência para a extensão de <i>primers</i> , identificação dos diferentes <i>SNP's</i> – Reação <i>SNaPshot</i>	34
III.2.8 Purificação dos fragmentos obtidos da reação com <i>SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)</i>	36
III.2.9 Desnaturação dos fragmentos de ADN e análise dos fragmentos em sequenciador automático	37
III.2.10 Leitura dos resultados	37
III.3. Análise Estatística	38
III.3.1 Análise das frequências genotípicas e génicas para cada uma das mutações	38
III.3.2 Análise de independência das frequências genotípicas das mutações F94L e nt821, e a origem do animal	39
III.3.3 Estudo da associação dos polimorfismos encontrados nas mutações F94L e nt821 com o fenótipo de cada animal	39



IV. Resultados e discussão	41
IV.1. Resultado da análise das frequências genotípicas e génicas para cada uma das mutações	47
IV.2. Resultado da associação das frequências genotípicas para as mutações F94L e nt821 e a origem do animal	56
IV.3. Resultados do estudo da associação dos polimorfismos encontrados nas mutações F94L e nt821 com o fenótipo de cada animal	58
V. Conclusão	69
VI. Bibliografia	70

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Evolução do peso de machos e fêmeas da raça bovina Limousine.....	5
Tabela 2 - Distribuição por categorias dos animais genotipados.....	25
Tabela 3 - Composição do <i>Gentra® Puregene® Blood Kit</i> .....	28
Tabela 4 - <i>Primers</i> utilizados para a reação <i>PCR</i> .....	31
Tabela 5 - Volumes por amostra utilizados na preparação da reação <i>PCR</i> .....	32
Tabela 6 - Programa do termociclador utilizada para a reação <i>PCR</i> .....	32
Tabela 7 - Programa do termociclador utilizado para a reação de purificação <i>ExoSap</i> .....	34
Tabela 8 - Volumes por amostra utilizados para a reação <i>SNaPshot</i> .....	34
Tabela 9 - <i>Primers</i> desenhados para a realização da reação <i>SNaPshot</i> .....	35
Tabela 10 - Cor emitida pelos fluorocromos dos respectivos <i>ddNTP's</i> .....	35
Tabela 11 - Programa do termociclador utilizado para a reação <i>SNaPshot</i> .....	36
Tabela 12 - Programa do termociclador utilizado para a reação de purificação com <i>SAP</i> .....	36
Tabela 13 - Informação para interpretação dos eletroferogramas.....	38
Tabela 14 - Distribuição dos genótipos observados para o gene da miostatina.....	43
Tabela 14 (continuação) - Distribuição dos genótipos observados para o gene da miostatina.....	44
Tabela 14 (continuação) - Distribuição dos genótipos observados para o gene da miostatina.....	45
Tabela 14 (continuação) - Distribuição dos genótipos observados para o gene da miostatina.....	46
Tabela 15 - Frequências genótípicas observadas para a mutação nt414.....	48
Tabela 16 - Frequências génicas observadas para a mutação nt414.....	48
Tabela 17 - Frequências genótípicas observadas para a mutação nt419.....	49
Tabela 18 - Frequências génicas observadas para a mutação nt419.....	49
Tabela 19 - Frequências genótípicas observadas para a mutação F94L.....	50
Tabela 20 - Frequências génicas observadas para a mutação F94L.....	50
Tabela 21 - Frequências genótípicas observadas para a mutação Q204X.....	51
Tabela 22 - Frequências génicas observadas para a mutação Q204X.....	51
Tabela 23 - Frequências genótípicas observadas para a mutação E226X.....	52
Tabela 24 - Frequências génicas observadas para a mutação E226X.....	52
Tabela 25 - Frequências genótípicas observadas para a mutação nt821.....	53
Tabela 26 - Frequências génicas para a mutação nt821.....	53
Tabela 27 - Frequências genótípicas observadas para a mutação E291X.....	54
Tabela 28 - Frequências génicas observadas para a mutação E291X.....	54
Tabela 29 - Frequências genótípicas observadas para a mutação C313Y.....	55
Tabela 30 - Frequências génicas observadas para a mutação C313Y.....	55
Tabela 31 - Número de animais por genótipo para a mutação F94L relativamente à origem dos animais.....	57
Tabela 32 - Número de animais por genótipo para a mutação nt821 relativamente à origem dos animais.....	57
Tabela 33 - Valores da estatística descritiva para cada variável resposta analisada na análise de variância.....	58
Tabela 34 - Resultados da análise de variância aos caracteres de crescimento para a mutação F94L.....	61
Tabela 35 - Resultados da análise de variância aos caracteres de conformação para a mutação F94L.....	61
Tabela 36 - Resultados da análise de variância aos caracteres de crescimento para a mutação nt821.....	61
Tabela 37 - Resultados da análise de variância aos caracteres de conformação para a mutação nt821.....	61
Tabela 38 - Valores da estatística descritiva para cada variável resposta analisada com o modelo misto.....	62
Tabela 39 - Resultados da Análise de Variância aos caracteres de crescimento e conformação da descendência dos animais genotipados para a mutação F94L.....	63

Tabela 40 - Resultados da Análise de Variância aos caracteres de crescimento e conformação da descendência dos animais genotipados para a mutação nt821 .....	64
Tabela 41 - Coeficientes de regressão linear do desenvolvimento muscular (DM) e aptidão funcional (AF) por cada cópia do alelo nt821 que o animal recebe do pai .....	64

## Índice de Figuras

Figura 1 - Gruta de Lascaux - A sala dos Touros.....	2
Figura 2 - Touro da raça Limousine (Equador).....	4
Figura 3 - Vaca, da raça Limousine, Abeldade, com sua filha Isa .....	4
Figura 4 - Mapa representativo da distribuição dos criadores da ACL em Portugal. ....	7
Figura 5 - Touro da raça Branco Azul Belga com a síndrome do duplo músculo e genótipo mh/mh.....	21
Figura 6 - Localização dos animais genotipados.....	26
Figura 7 - Esquema representativo do gene da miostatina com a localização respetiva de cada uma das mutações selecionadas.....	27
Figura 8 - Fotografia de um gel de agarose realizado.....	33
Figura 9 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação nt414 .....	48
Figura 10 - Distribuição das frequências génicas observadas para a mutação nt414 .....	48
Figura 11 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação nt419 .....	49
Figura 12 - Distribuição das frequências génicas observadas para a mutação nt419 .....	49
Figura 13 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação F94L.....	50
Figura 14 - Distribuição das frequências génicas observadas para a mutação F94L.....	50
Figura 15 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação Q204X...51	
Figura 16 - Distribuição das frequências génicas observadas para a mutação Q204X.....	51
Figura 17 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação E226X ...52	
Figura 18 - Distribuição das frequências génicas observadas para a mutação E226X .....	52
Figura 19 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação nt821 .....	53
Figura 20 - Distribuição das frequências génicas observadas para a mutação nt821 .....	53
Figura 21 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação E291X ...54	
Figura 22 - Distribuição das frequências génicas observadas para a mutação E291X .....	54
Figura 23 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação C313Y ...55	
Figura 24 - Distribuição das frequências génicas observadas para a mutação C313Y .....	55
Figura 25 - Distribuição quanto à origem dos animais das frequências genotípicas para a mutação F94L.....	57
Figura 26 - Distribuição quanto à origem dos animais das frequências genotípicas para a mutação nt821 .....	57
Figura 27 - Média do peso ao nascimento relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação F94L.....	65
Figura 28 - Média do peso aos 120 dias relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação F94L .....	65
Figura 29 - Média do peso aos 210 dias relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação F94L.....	65
Figura 30 - Média do desenvolvimento muscular relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação F94L .....	66
Figura 31 - Média do desenvolvimento esquelético relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação F94L .....	66
Figura 32 - Média da aptidão funcional relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação F94L.....	66
Figura 33 - Média do peso ao nascimento relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação nt821 .....	67
Figura 34 - Média do peso aos 120 dias relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação nt821 .....	67
Figura 35 - Média do peso aos 210 dias relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação nt821 .....	67
Figura 36 - Média do desenvolvimento muscular relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação nt821 .....	68
Figura 37 - Média do desenvolvimento muscular para os genótipos da mutação nt821 .....	68
Figura 38 - Média do desenvolvimento esquelético relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação nt821 .....	68
Figura 39 - Média do desenvolvimento esquelético para os genótipos da mutação nt821 ....	68

Figura 40 - Media da aptidão funcional relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação nt821 .....	68
Figura 41 - Média da aptidão funcional para os genótipos da mutação nt821 .....	68

## Índice de Esquemas

Esquema 1 - Evolução e factores que regulam a miogénese.....	16
Esquema 2 - Passo-a-passo da genotipagem de <i>SNP's</i> .....	27
Esquema 3 - Componentes do <i>QUIAGEN® Standard Multiplex PCR Kit</i> .....	30

## **Índice de Equações**

Equação 1 - Formula de obtenção do peso aos 120 dias .....	8
Equação 2 - Formula de obtenção do peso aos 210 dias .....	9
Equação 3 - Expressão utilizada para o cálculo de diluição de soluções.....	31
Equação 4 - Expressão utilizada para o cálculo das frequências genotípicas .....	38
Equação 5 - Expressão utilizada para o cálculo das frequências génicas .....	39

## Índice de Símbolos

ACL - Associação Portuguesa de Criadores da Raça Bovina Limousine  
ADN – Acido desoxirribonucleico  
AF - Aptidão Funcional  
*AFLP - Amplified fragment length polymorphism*  
CCr - Capacidade de crescimento até aos 210 dias  
CMt - Capacidade maternal  
DGP - Direção Geral de Pecuária  
DM - Desenvolvimento muscular  
DS - Desenvolvimentos Esquelético  
EUROLIM - Federação Europeia das Associações de Criadores da Raça Limousine  
*GDF-8 - Fator de Crescimento Diferencial – 8,*  
GMD - Ganho Medio Diário  
*GS - Genomic Selection*  
*GWS - Genome Wide Selection*  
*HLB - Herd Book Limousine*  
IC - Índice de Conversão  
INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária  
IP - Intervalo entre Partos  
LGM - Laboratório de Genética Molecular  
*MAS - Marker Assisted Selection*  
*MRF - Myogenic regulator factors*  
P120 - Peso aos 120 dias  
P210 - Peso aos 210 dias  
*PCR - Polymerase chain reaction*  
PN - Peso ao Nascimento  
QR - Qualidades Raciais  
*QTL - Quantitative Trait Loci*  
*RAPD - Random amplified polymorphic DNA*  
*RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism*  
*SNP - Single Nucleotide Polymorphism*  
*SSR - Simple sequences repeats*  
TE - Temperamento  
*TGF- $\beta$  - Transforming Growth Factor Beta superfamily*



## I. Introdução

A raça bovina Limousine chegou a Portugal em 1929, proveniente de França. Desde esta data que o efetivo se encontra em constante crescimento, mas de uma forma equilibrada, utilizando-se, atualmente, em linha pura e em cruzamento terminal com particular interesse nas raças autóctones. Estes aspetos, em conjunto, traduzem-se numa expansão no mercado nacional.

As características atribuídas a esta raça passam pela grande facilidade ao parto, pela docilidade e rusticidade, que permitem uma grande facilidade de manejo, pela velocidade de crescimento, bem como pela qualidade da carne. Estes fatores contribuíram, sem dúvida, para a expansão da raça.

Determinadas alterações genéticas podem provocar algumas características interessantes, que por sua vez poderão ser aproveitadas por seleção animal. No entanto, também poderão ocorrer efeitos menos desejáveis, pelo que será importante avaliar o impacto de uma mutação em diversas características.

Uma dessas alterações verifica-se no gene da miostatina (*Fator de Crescimento Diferencial - 8*, *GDF-8*), observando-se em resultado das mutações ocorridas uma inibição da atividade desta proteína. Um dos resultados desta inibição foi o aumento do desenvolvimento muscular, observado em algumas raças bovinas, revelando-se extremamente útil, no entanto observam-se também algumas desvantagens, nomeadamente a redução da fertilidade nas fêmeas ou a menor viabilidade dos vitelos.

Diversos estudos têm sido realizados nas raças bovinas, um pouco por todo o Mundo, inclusive em Portugal, com o objetivo de analisar as alterações ao nível do gene da miostatina. Neste sentido surgiu o interesse por parte da Associação Portuguesa de Criadores da Raça Bovina Limousine (ACL), em conhecer e caracterizar melhor a população de bovinos Limousine em Portugal. Consequentemente procedeu-se a um estudo que envolveu uma amostra da população bovina Limousine existente em Portugal e que teve como objetivo estudar as mutações existentes no gene da miostatina. Este estudo, numa primeira fase, pretende implementar a análise laboratorial à mutação específica da raça bovina Limousine (F94L), para posteriormente se proceder à avaliação das frequências genéticas e genotípicas. Adicionalmente, pretende-se avaliar o efeito de várias mutações do gene da miostatina em alguns caracteres de crescimento e de conformação.

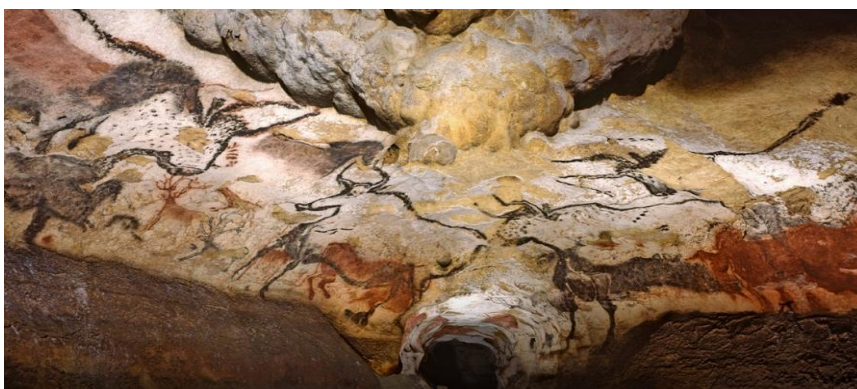
## II. Revisão bibliográfica

### II.1. Raça Limousine

#### II.1.1. A história dos bovinos da raça Limousine

É sugerido em várias fontes ligadas à raça bovina Limousine, a nível internacional, semelhanças entre estes e os bovinos pintados nas grutas de Lascaux em Montinac, região de Aquiten – França (datadas com mais de 20 000 anos e consideradas património mundial da humanidade pela UNESCO) dado retratarem vacas e touros de cor vermelha acastanhada. (Figura 1).

Figura 1 - Gruta de Lascaux - A sala dos Touros



Fonte: Adaptado de [http://www.lascaux.culture.fr/#/fr/02\\_01.xml](http://www.lascaux.culture.fr/#/fr/02_01.xml)

A raça Limousine é originária das províncias de Limousine e Marche. As características orográficas nestas províncias eram bastante difíceis, pois possuíam um tipo de terreno muito pobre com solos rochosos, acidentados e de bastante relevo. Para além das difíceis condições orográficas as condições climatéricas eram, também, adversas. As condições edafoclimáticas tornaram, com o passar dos anos, os animais Limousine numa raça robusta, com um elevado grau de resistência às enfermidades e com enorme facilidade de adaptação a diferentes ambientes, o que possibilitou a sua grande dispersão mundial, facto que se verifica, ainda, nos dias de hoje (<http://www.nalf.org/history.php>).

Ao longo dos anos, a raça começou a ganhar reputação não só como animal de trabalho, mas também como excelente produtor de carne. Um dos grandes impulsionadores para a melhoria da raça, que começou por aplicar uma rigorosa seleção dos animais, foi Charles Leobary que, entre os anos de 1854 e 1896, conseguiu angariar 265 prémios de prestígio com os seus animais, no mais conceituado concurso de bovinos - o *Bordeaux Competition*. O aumento da notoriedade da raça levou a que, a 18 de novembro de 1886, em França, fosse criado o primeiro livro genealógico da raça bovina Limousine, *Herd-Book Limousin*, formado por um comité de doze elementos, presidido por Louis Michel, que estabeleceu um regulamento técnico com o objetivo de uniformizar a raça Limousine. Mais tarde o *Herd-*

*Book Limousin* sofreu alguns ajustes de forma a colmatar as exigências que se foram sentindo a nível da seletividade e do melhoramento da raça. O número de animais inscritos foi sempre aumentando nos anos seguintes, no entanto, quatro anos depois da primeira guerra mundial, e após ter sofrido uma reestruturação, no ano de 1920, o *Herd-Book Limousin* fechou. O declínio da raça Limousine foi cada vez maior, atingindo o seu ponto mais baixo nos anos de 1930, ocorrendo a grande reviravolta trinta anos mais tarde, na década de 60, vindo a partir desta data a crescer e a apresentar-se nos dias de hoje como uma raça mundialmente conhecida e com grande distribuição.

A chegada a Portugal aconteceu no século XX, ano de 1929. O livro genealógico da raça Limousine em Portugal denominado de *Herd-Book* português da raça Limousine (*HBL*), foi instituído em 1984, pela então Direção Geral de Pecuária (DGP). A título de curiosidade, refere-se que o primeiro registo no *HBL* aconteceu a 5 de novembro de 1984.

Seis anos mais tarde, em 1990, este mesmo *HBL* português foi transferido para a Associação Portuguesa de Criadores de Bovinos da Raça Limousine (ACL), criada a 13 de novembro de 1989. Desde então, esta associação tem vindo a gerir o livro genealógico, tendo efectuado alterações ao regulamento técnico em 1994, com o objetivo de conter todas as regras básicas definidas pela associação de criadores francesa e estipuladas pela EUROLIM Federação Europeia das Associações de Criadores da Raça Limousine.

### **II.1.2 Características da Raça**

Os animais da raça Limousine em Portugal são utilizados não só em linha pura mas também em cruzamento terminal, maioritariamente, com raças autóctones.

O animal da raça Limousine possui um conjunto de características fenotípicas, que permitem classificar o animal como puro-sangue Limousine, e que se denomina, habitualmente, de “padrão da raça”. Neste contexto a Associação Portuguesa de Criadores da Raça Bovina Limousine (ACL) define que estes animais devem apresentar uma pelagem com uma distribuição uniforme da cor flava, apresentando uma tonalidade mais clara na região do ventre, períneo, escroto ou úbere e também na extremidade da cauda, devendo as mucosas apresentar um tom claro. Esta coloração mais clara está também presente em redor dos olhos e focinho, que aparece de uma forma particular, em forma de auréola, sendo, por isso, uma das características da raça Limousine.

Salienta-se na região do tronco um tórax profundo, costado bem arqueado e cheio, ligado à espádua, proporcionando assim um peito largo e arredondado. O dorso deve ser horizontal e bem musculado; com ancas pouco salientes e a bacia deve ser larga, em especial ao nível dos ísquiones e trocânteres possibilitando boa facilidade de parto e um bom

desenvolvimento da gestação permitindo, ainda, uma boa inserção do úbere que possibilita uma grande e prolongada capacidade leiteira.

Estes animais devem, ainda, apresentar um lombo largo, nádegas espessas, bem descidas e arredondadas (Figura 2).

Figura 2 - Touro da raça Limousine (Equador)



Fonte: <http://www.limousineportugal.com/imagens/8Sa.jpg>

Outras características que definem estes animais, são uma cabeça pequena, curta com fronte larga e sub-convexa, o pescoço deve apresentar-se igualmente curto. As orelhas deverão ser de tamanho medio e bastante expressivas, delgadas e pouco revestidas de pelos surgindo por de baixo de uns cornos de dimensão reduzida, arredondados e arqueados para a frente com um tom claro. Os olhos são grandes e salientes. Por fim, a cauda deve apresentar-se pouco saliente mas bem inserida e com uma terminação num tufo de pelos finos.

A conjugação de todas estas características permite obter um animal proporcional no estado adulto de grande corpulência, comprido, largo, com uma linha dorso lombar horizontal e com um terço posterior bem desenvolvido, de membros finos mas sólidos (Figura 3).

Figura 3 - Vaca, da raça Limousine, Abelidade, com sua filha Isa



Fonte: <http://www.limousineportugal.com/conteudo.php?cat=1&cat1=5&cat2=5&cat3=0&idioma=pt>

Os pesos médios registados em Portugal e no país de origem da raça Limousine são apresentados na tabela 1. Embora os animais apresentem pesos elevados em adulto, ao nascimento os vitelos são considerados pequenos, em comparação com outras raças. Contudo, rapidamente os animais começam a desenvolver-se, evidenciando um ganho médio diário (GMD) de 1,16Kg e 1,5Kg até ao desmame e depois na fase de engorda, respetivamente (*Qualities of the Limousin breed* retirado de <http://www.limousine.org>).

Tabela 1 - Evolução do peso de machos e fêmeas da raça bovina Limousine

	Pesos (kg)			
	França		Portugal <sup>c</sup>	
	Machos <sup>b</sup>	Fêmeas	Machos	Fêmeas
<b>Nascimento</b>	42,9	39 <sup>a</sup>	42	40
<b>120 Dias</b>	177	162 <sup>a</sup>	170	160
<b>210 Dias</b>	289	258 <sup>a</sup>	286	252
<b>Adulto</b>	1000-1300	650-850 <sup>b</sup>	1000	700

Fonte: <sup>a</sup>*Qualities of the Limousin breed* retirado de [www.limousine.org](http://www.limousine.org)

<sup>b</sup> <http://en.france-genetique-elevage.org/Limousine,377.html>

<sup>c</sup>Dados fornecidos pela ACL

De acordo com os dados publicados pela organização francesa, 99% dos partos decorrem sem assistência, registando-se, também, uma fertilidade elevada, devido à estrutura morfológica que os animais Limousine apresentam, levando a conjugação destes fatores a que seja possível alcançar uma produtividade numérica ótima de 93 vitelos desmamados por cada 100 vacas cobertas (*Qualities of the Limousin breed* retirado de <http://www.limousine.org>).

É, ainda, de ressaltar a grande longevidade das fêmeas Limousine que apesar de atingirem o seu auge produtivo, somente, na idade compreendida entre os 6 e os 8 anos, mantêm um nível de produtividade constante até cerca dos 10/12 anos, permitindo, assim, obter um maior número de vitelos provenientes de uma só vaca, ao longo da vida produtiva (*Qualities of the Limousin breed* retirado de <http://www.limousine.org>). No que respeita, ao comportamento animal, esta raça é de fácil manejo, caracterizando-se por apresentar uma grande docilidade. É uma raça rustica, resultado das suas origens, que se adapta bem às variações climáticas e orográficas.

Em países como Austrália, Estados Unidos da América, Reino Unido e Canadá, ocorre uma situação particular onde para além de existir um efetivo puro de animais Limousine, que permanece em constante evolução, existe outro efetivo com grande expressão, em que a

raça Limousine é cruzada com as raças Aberdeen Angus e Red Angus, sendo estes denominados por animais *Lim-Flex*. Consequentemente, estes animais apresentam algumas diferenças, podendo ser admitidos animais de cor preta, por comparação com os existentes em países como Portugal e França (Noticias Limousine, 2013).

### II.1.3 Aptidão dos bovinos da raça Limousine

A longa história desta raça, fez com que a sua utilização se fosse adequando com a evolução agrícola. Quando estes animais começaram a ser utilizados pelo homem, século XVII, serviam não só para a produção de carne mas, também, como animais de força, animais de trabalho.

Nos dias de hoje, a raça é apenas referenciada como produtora de carne, como resultado dos seus elevados níveis de rendimento e de qualidade de carne.

Apesar destas qualidades serem características dos Limousine, existem três classificações morfológicas distintas, apresentando-se a constituição músculo-esquelética de cada animal como principal fator de variação.

Assim, a classificação pode ser feita em *Boucherie*, *Elevage*, e *Mixte*.

- O termo *Boucherie*, provem do francês, estando o seu significado ligado ao comércio de carne, talho. Assim, os animais com esta classificação apresentam-se com um desenvolvimento muscular superior ao desenvolvimento esquelético, mais baixos, mais largos e com maior rendimento em carcaça, verificando-se em geral um crescimento mais precoce.
- O termo *Elevage*, tal como o anterior, é uma palavra de origem francesa cujo significado é criação, criação de animais. Os animais deste tipo apresentam-se com desenvolvimento esquelético superior ao desenvolvimento muscular, resultando em animais mais altos e com um crescimento mais tardio.
- O termo *Mixte*, um adjetivo francês, que tem como significado a palavra misto, é atribuído aos animais que, tal como a palavra indica, são uma mistura das duas classificações anteriores. Estes possuem um equilíbrio entre o desenvolvimento muscular e o desenvolvimento esquelético, encontrando-se neste grupo a grande maioria dos animais Limousine.

A aptidão da raça como produtora de carne, foi construída desde a sua origem, dado o seu desenvolvimento se ter efetuado em condições difíceis a todos os níveis o que permitiu que hoje em dia, estes animais, tenham um bom índice de conversão alimentar (IC), mesmo quando ingerem alimentos pouco refinados, tais como pastagens espontâneas.

Os resultados são rendimentos em carcaça de 62% a 65%, onde mais de 75% das carcaças de vitelos são classificadas como “E” ou “U”, segundo a classificação europeia de carcaças “SEUROP” (*Qualities of the Limousin breed* retirado de <http://www.limousine.org>).

#### II.1.4 A raça em Portugal

A maior incidência de bovinos Limousine em Portugal localiza-se, principalmente, na região do rio Mira. Contudo é em toda a região Alentejana que se verifica a maior concentração de produtores associados a nível nacional, embora estes estejam distribuídos por todo o território, à exceção da região autónoma da Madeira, existindo 189 criadores e 226 explorações (Figura 4).

Atualmente, segundo a ACL, estão ativos 12238 fêmeas e 6648 machos nos criadores associados e inscritos no *HBL*, encontrando-se 20 animais em média por exploração, em virtude de a maioria dos criadores açorianos possuir apenas entre 2 a 5 animais.

Em Portugal, o modo de produção utilizado, pela grande maioria dos produtores, passa pelo sistema extensivo, em que os animais se encontram, geralmente, em pastagem, alimentando-se de pastagens naturais, forragens e fenos. No entanto existem também explorações em regime intensivo e semi-intensivo. Há que ressaltar que em Portugal, segundo o Regulamento Técnico do *Herd-Book* Português da Raça Limousine, são considerados três tipos de criadores; criador selecionador, multiplicador e produtor de carne.

Figura 4 - Mapa representativo da distribuição dos criadores da ACL em Portugal.



Fonte:  
<http://www.limousineportugal.com/conteudo.php?idm=11>

#### II.1.5 Esquema de Seleção

Em Portugal, a seleção dos futuros reprodutores é efetuada com base no mérito genético, no conhecimento da genealogia e na avaliação morfológica. Não havendo uma estratégia única, os criadores normalmente privilegiam animais com valores genéticos positivos para ambos os componentes do peso ao desmame (efeitos diretos e capacidade maternal) e para o potencial genético do desenvolvimento muscular. Esta informação é disponibilizada pela ACL aos criadores de diversas formas, quer a através do *site* da ACL, quer de relatórios por exploração.

A partir de toda a informação de campo recolhida, nomeadamente, registos de genealogias, de crescimento e de avaliação morfológicas foi possível realizar a última avaliação genética

da raça bovina Limousine em Portugal elaborada no Polo de Investigação da Fonte Boa do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., a partir de toda a informação de campo recolhida pela Associação de Criadores Limousine, nomeadamente registos de genealogias (n=87907), pesos e avaliações morfológicas, incluindo informação de mais de 34500 animais com informação produtiva, nomeadamente, registo de pesos, avaliação morfológica ou de partos.

Nesta avaliação foram incluídos os seguintes caracteres:

- Capacidade de crescimento até aos 210 dias (CCr)
- Capacidade maternal (CMt)
- Desenvolvimento muscular (DM)
- Desenvolvimento Esquelético (DS)
- Aptidão Funcional (AF)
- Intervalo entre Partos (IP)
- Temperamento (TE)

Todos os caracteres foram submetidos a análises uni variadas, através do *BLUP* - Modelo Animal, utilizando-se para o efeito o programa MTDFREML (Carolino e Verissimo, 2012).

O esquema de seleção da raça Limousine em Portugal, baseia-se no funcionamento do *HBL* e no controlo de performances, tendo este último por finalidade principal estimar o valor genético dos animais da raça Limousine, para diversos caracteres de crescimento, a partir dos resultados do crescimento ponderal antes do desmame e da conformação dos vitelos; adicionalmente, visa ainda a caracterização do potencial individual de crescimento, da aptidão dos animais para produção de carne e para reprodução.

São efetuadas, assim, três pesagens dos vitelos nas explorações;

- Peso ao nascimento (PN), peso recolhido pelo criador aquando do nascimento do animal.
- Peso aos 120 dias (P120), peso ajustado obtido através da fórmula (Equação 1);

Equação 1 - Formula de obtenção do peso aos 120 dias

$$P120 = ((P2 - P1)/(A2 - A1)) \times (AT - A1) + P1$$

Onde: P1 - Peso à primeira pesagem, P2 - Peso à segunda pesagem, A1 - Idade em dias à primeira pesagem, A2 - Idade em dias à segunda pesagem, AT - Idade Tipo (120 dias). Nenhum dos pesos é o peso ao nascimento, a 1ª pesagem (P1) deve ser feita antes dos 130 dias, a 2ª pesagem (P2) deve ser feita antes dos 230 dias, intervalo entre as duas pesagens (A2 - A1) não pode ser inferior a 60 dias nem exceder os 130 dias.



- Peso aos 210 dias (P210), peso ajustado obtido através da fórmula (Equação 2);

Equação 2 - Formula de obtenção do peso aos 210 dias

$$P210 = ((P2 - P1) / (A2 - A1)) \times (AT - A1) + P1$$

Onde: P1 - Peso à primeira pesagem, P2 - Peso à segunda pesagem, A1 - Idade em dias à primeira pesagem, A2 - Idade em dias à segunda pesagem, AT - Idade Tipo - (210 dias). Nenhum dos pesos é o Peso de Nascimento, um dos pesos deve ser feito depois dos 150 dias, a outra pesagem pode ser feita entre os 0 e os 300 dias, intervalo entre as duas pesagens não pode exceder os 130 dias.

O controlo de performances inclui, ainda, uma avaliação morfológica ao desmame, considerando-se os seguintes parâmetros;

- Desenvolvimento muscular (DM) – avalia-se o comprimento, a largura e a espessura do dorso e da nádega.
- Desenvolvimento esquelético (DS) - para este parâmetro são pontuados a forma e comprimento do tronco e as dimensões da bacia.
- Aptidão Funcional (AF) - neste parâmetro é observada a facilidade de movimento, a atitude da linha dorsal em movimento, a largura do focinho, a solidez e a correção dos aprumos.
- Qualidades raciais (QR) - neste parâmetro avalia-se a conformidade dos animais em relação ao padrão da raça, permitindo deste modo eliminar os que não se encontram conformes.

A partir do ano de 2007 a ACL começou, também, a registar dados relativos ao temperamento (TE) dos animais, realizando-se esta avaliação através da sua observação em grupo e separados.

No caso dos touros, que segundo o regulamento apresentem as características mínimas necessárias, é efetuada uma segunda avaliação morfológica realizada entre os 14 e os 18 meses, estando a pontuação adaptada ao animal adulto

As fêmeas reprodutoras são controladas desde o início da sua atividade reprodutiva e todos os partos são registados, ao longo da vida, o que permite obter informação sobre o intervalo entre partos.

### **II.1.6 A raça no Mundo**

A raça Limousine está dispersa um pouco por todo o planeta, encontrando-se representada em alguns países por associações de criadores, e apresentando um peso percentual elevado no efectivo bovino total do país respetivo (<http://www.limousin-international.com/history.htm>).

Tudo começou em França, berço da raça Limousine, onde atualmente existem 72 753 fêmeas da raça bovina Limousine registadas no *Herd-Book* francês, e um efetivo total de fêmeas da raça Limousine de 1076000 (<http://en.france-genetique-elevage.org/Limousine.377.html>).

A raça estendeu-se depois por Argentina, onde os primeiros animais chegaram nos anos 60, mais concretamente em julho de 1966, e após uma tentativa falhada de introduzir a raça em 1924. Foi nesta mesma época que a raça começou a ser conhecida nos Estados Unidos, embora só em 1971 tenham começado a chegar os animais que ficariam, permanentemente, neste país (<http://www.limousin-international.com/history.htm>).

Em Espanha, só à segunda tentativa, em 1962, é que a raça se conseguiu fixar como raça pura, depois de ter falhado, em 1958, uma primeira com o objetivo de introduzir alguns animais Limousine para melhorar a raça Murciana ([http://www.razalimousin.org/raza\\_info.html](http://www.razalimousin.org/raza_info.html)). No Canadá, os primeiros exemplares da raça chegaram de França em 1968. Ao Reino Unido chegaram três anos depois. Em 1973 foi a vez de a Bélgica oficializar o seu interesse pela raça com a criação do *Herd-Book*.

Em 1978, chegaram ao Brasil, provenientes de França, 56 animais ocorrendo a partir desta data a implementação neste país, e verificando-se nas décadas seguintes a importação de mais animais (<http://www.limousin-international.com/history.htm>).

Na europa, a raça não chegou só a Espanha, Bélgica e Reino Unido mas também a Itália no ano de 1968, acontecendo a sua entrada na Holanda e Dinamarca no ano de 1969 e 1970, respetivamente (<http://www.limousin-international.com/history.htm>).

No outro lado do planeta, na Austrália e Nova Zelândia, a raça começou por marcar presença quando em 1972 foi importado para ambos os países sêmen proveniente do Reino Unido. Pouco tempo depois foi feita a primeira importação de animais para a Nova Zelândia, vindos do Reino Unido e da Republica da Irlanda. No ano de 1975, os primeiros animais puro-sangue Limousine chegam à Austrália oriundos da Nova Zelândia (<http://www.limousin-international.com/history.htm>).

Para além destes países, existem muitos outros onde esta raça se pode encontrar, desde a populosa China, passando por países como Cuba e Africa do Sul até países, onde o frio se faz sentir com bastante severidade como a Finlândia, marcando presença, atualmente, em mais de 70 países em todo o mundo (<http://www.limousin-international.com/history.htm>).

## **II.2. Métodos de seleção**

Desde há muitos anos, que o Homem seleciona os animais que fazem parte do ambiente onde está inserido. Esta seleção era realizada com o objetivo de melhorar uma ou várias características, visando a obtenção de resultados desejados ao longo das gerações.

Inicialmente, os métodos utilizados para selecionar os animais para determinado carácter, fundamentavam-se na avaliação fenotípica. Os “melhores animais” eram escolhidos para reprodutores essencialmente a partir da sua avaliação morfológica e, mais tarde, a partir do seu desempenho produtivo.

No entanto, com a evolução da produção animal, os métodos de seleção evoluíram, também, como resultado dos novos conhecimentos adquiridos nas áreas da genética mendeliana, genética quantitativa e mais recentemente na genética molecular, conjugando estas três áreas com o avanço das diversas técnicas na área da biotecnologia.

Uma evolução significativa na área da seleção animal deu-se com a utilização conjunta da informação fenotípica e genealógica de um determinado animal e da sua progénie. Esta metodologia utiliza-se, ainda hoje, sendo por isso considerada o meio mais eficaz de seleção, possibilitando a determinação do valor de um animal como reprodutor e facultando a informação quanto à sua superioridade ou inferioridade genética para um dado carácter, bem como fornecendo informação quanto à transmissibilidade à descendência.

Este valor designado por valor genético estimado tem, também, em conta a heritabilidade do carácter em causa, o quanto é transmissível à descendência, ou seja, considera a variância fenotípica que é de natureza genética aditiva (Gama, 2002).

O método pode ser utilizado considerando cinco fontes de informação diferentes, optando-se pela forma mais adequada consoante a situação e o carácter a seleccionar.

A seleção a partir de registos repetidos do próprio animal é uma delas, conseguindo-se desta forma obter uma elevada precisão do valor genético. A seleção a partir dos registos nos descendentes, ascendentes, parentes colaterais ou em caracteres correlacionados são outras quatro hipóteses, podendo ocorrer a sua utilização em simultâneo para estimar o valor genético de um animal através da criação de um índice de seleção, envolvendo este uma maior diversidade de informação. No entanto, o facto de não considerar os efeitos ambientais pode levar a uma baixa precisão do valor genético (Gama, 2002).

Assim, para colmatar este e outros problemas foi criado por Henderson em 1949, e apresentado formalmente em 1973 (Resende & Perez, 1999), um método que utiliza todas as performances registadas quer do animal, do qual se pretende fazer a avaliação genética, quer dos seus parentes (descendentes, ascendentes e colaterais) e que considera, também, os efeitos ambientais.

Este método designado por *Best Linear Unbiased Prediction*, *BLUP*-Modelo animal baseia-se num modelo misto que permite estimar, simultaneamente, os efeitos fixos (por exemplo, estábulos) e os valores genéticos de todos os indivíduos na base de dados (desde que

tenham parentescos com indivíduos que possuam registos). O valor genético de cada animal é estimado com base na informação de todos os seus parentes e leva em conta os efeitos fixos que afetam os registos (por exemplo, efeito da exploração). Por sua vez, as estimativas dos efeitos fixos também consideram o valor genético dos animais.

Deste modo, consegue-se um equilíbrio entre animais que estão sujeitos a ambientes de produção mais favoráveis e a ambientes de produção menos favoráveis e, também, uma proporcionalidade entre o grau de parentesco e o respetivo peso da informação genética, a fim de se obter o valor genético estimado tendo em conta os efeitos ambientais (Gama, 2002).

Embora a eficácia deste método seja elevada, recorrendo-se a ele para estimar os parâmetros genéticos um pouco por todo o mundo quando se pretende implementar um programa de melhoramento animal, surgiram nos últimos anos métodos que não só permitiram aumentar a eficiência deste como, também, permitiram aumentar a especificidade da seleção.

As novas metodologias de seleção baseiam-se na informação fornecida pelo ADN, utilizando-se de forma autónoma ou como auxiliares da seleção fenotípica, a partir da informação do genótipo.

Estas foram desenvolvidas com o objetivo de colmatar as situações onde a precisão da seleção era menor, como a mensuração de caracteres difíceis; caracteres com baixa heritabilidade, caracteres onde os custos e a dificuldade de mensurar são elevados e circunstâncias onde o resultado da seleção só é verificável após o abate do animal (Meuwissen, 2003).

Um dos métodos resultantes da evolução da biologia molecular e da genómica é a seleção assistida por marcadores – *MAS (Marker Assisted Selection)*, apresentada por Lande e Thompson em 1990 que recorre a dados fenotípicos e a marcadores moleculares, possuindo estes últimos uma ligação génica próxima aos *QTL (Quantitative Trait Loci)* (Resende *et al.*, 2008).

Inicialmente, este método apresentava-se algo limitado o que interferia nos resultados esperados com a sua aplicação pois, para além de haver dificuldade no mapeamento dos *QTL's*, os marcadores genéticos ligavam-se apenas a uma pequena proporção dos genes que controlam os caracteres de maior interesse económico na produção animal e, consequentemente, a variação genética também era explicada apenas numa pequena parte. No entanto, em 2001, Meuwissen *et al.* propôs uma variante da *MAS* por forma a ultrapassar essas limitações, a qual denominou de seleção genómica – *GS (Genomic Selection)* ou seleção genómica ampla – *GWS (Genome Wide Selection)* (Resende *et al.*, 2008).

Este tipo de seleção, usando igualmente marcadores, tem a capacidade de abranger uma secção maior do genoma, onde, no caso de um carácter quantitativo, abrange muitos genes

que o influenciam podendo assim explicar grande parte da variância genética. Os marcadores usados pela GWS são do tipo *SNP* (*Single Nucleotide Polymorphism*), os quais detetam, polimorfismos resultantes da alteração de um único par de bases do genoma, após os seus efeitos genéticos terem sido estimados a partir de dados fenotípicos de uma amostra da população. (Resende *et al.*, 2008).

### **II.3. Marcadores Genéticos**

A evolução dos marcadores genéticos tem originado uma melhor compreensão e um melhor estudo da diversidade genética, proporcionando a sua aplicabilidade no melhoramento genético animal bem como em outras áreas onde a sua existência e o seu contributo são fundamentais.

Presentemente, existem diversos tipos de marcadores genéticos, possibilitando uma escolha de acordo com os resultados que se pretendem obter, bem como, de acordo com a situação em causa, podendo-se considerar quatro tipos; os morfológicos, os citológicos, os bioquímicos e os moleculares.

Iniciando a descrição de cada marcador genético pelo marcador morfológico, este encontra-se associado às características exteriores do animal e pode ser utilizado para identificar, caracterizar e classificar a evolução genética, tanto de diferentes espécies como de uma população. A sua obtenção pode ser feita por medição da característica em causa ou, simplesmente, por observação direta. No entanto, este tipo de marcador encontra-se limitado às características quantitativas (Referido em Yang *et al.*, 2013).

Quanto aos marcadores citológicos, estes estão relacionados com o número e a morfologia dos cromossomas, passando a sua aplicação pela localização de um determinado gene, bem como pela localização deste relativamente a outros genes (Referido em Yang *et al.*, 2013).

No que concerne aos marcadores bioquímicos, estes utilizam as proteínas solúveis e a composição dos aminoácidos das isoenzimas como resultado da expressão dos genes, para avaliar a variação genética (Referido em Yang *et al.*, 2013).

Todos os marcadores referidos até agora apresentam duas limitações que, de algum modo, interferem na precisão do estudo da diversidade do genoma ou seja, são influenciáveis pelos fatores ambientais existindo um número reduzido de marcadores idênticos (Referido em Yang *et al.*, 2013).

Assim, para o desenvolvimento da produção animal o recurso à informação do ADN é uma mais-valia que se tem revelado não só na avaliação da variabilidade genética, como, também, na obtenção de uma maior precisão de resultados nos programas de melhoramento animal, conseguindo-se obter esta informação a partir de marcadores

moleculares ou seja, marcadores com base no ADN, isto é, em mutações que ocorrem em sequências nucleótídicas no genoma de um indivíduo.

Atualmente, a avaliação dos polimorfismos, existentes no ADN, pode ser feita recorrendo a vários tipos de marcadores moleculares, apresentando-se de seguida alguns deles.

O primeiro método utilizando marcadores moleculares surgiu em 1974, por Grodzicher *et al* (Referido em Yang *et al.*, 2013), e analisava o polimorfismo dos fragmentos de restrição do ADN genómico, denominando-se os marcadores de *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Foram, também, estes marcadores os primeiros a ser utilizados na construção de mapas genéticos para além de terem sido empregues como auxiliares em programas de melhoramento animal (Referido em Polido *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

Os polimorfismos no ADN são detetados através de hibridização com radioatividade, ou usando compostos químicos que desencadeiam uma reação de fluorescência, apresentando vantagens como a codominância dos marcadores, capacidade de distinguir heterozigotos e homozigotos, e a facilidade de reprodução destes. Por outro lado, são conhecidos alguns inconvenientes que limitam a sua utilização, como o facto de ser bastante dispendioso e demorado para além de necessitar de grande quantidade de ADN genómico e de utilizar reagentes radioativos (Referido em Polido *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

Tendo por base estas e outras limitações, e com o avanço da técnica de *PCR* (Polymerase chain reaction), foram desenvolvidos outros tipos de marcadores com métodos mais rápidos e menos dispendiosos, baseando-se um deles, os *RAPD* (*Random amplified polymorphic DNA*), na amplificação de polimorfismos usando pequenos *primers* aleatórios através de uma reação *PCR*. Apesar de algumas das limitações dos *RFLP*'s serem superadas com este novo método, ele acaba por ter uma repetibilidade baixa sendo os marcadores dominantes ou seja, torna-se impossível distinguir um homozigoto de um heterozigoto (Referido em Polido *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

Os marcadores moleculares do tipo *AFLP* (Aplified fragment length polymorphism) são um melhoramento dos *RADP*'s, resultando o seu método de uma combinação entre a técnica utilizada para os *RFLP* e a reação *PCR*, ou seja, combina a ação das enzimas de restrição com a capacidade de deteção de polimorfismos da técnica de *PCR*, tornando o seu procedimento mais rápido e económico, permitindo a genotipagem automática. Os *AFLP*'s no que concerne à distinção entre os indivíduos homozigotos e heterozigotos não são capazes de ultrapassar esta limitação (Referido em Polido *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

Os *SSR* (*Simple sequences repeats*) são outra classe de marcadores que tem por base a repetição de sequências simples, também denominados de marcadores microssatélites que se encontram amplamente distribuídos pelo genoma. Em virtude das sequências que flanqueiam os microssatélites se encontrarem bem conservadas, torna-se possível criar *primers* e através da reação *PCR* amplificar a sequência repetida ou seja, os

microsatélites, possibilitando posteriormente a detecção dos polimorfismos por eletroforese (Referido em Polido *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

Estes marcadores possuem por um lado um grau de reprodutividade elevado, são codominantes e multialélicos, mas apresentam por outro lado um tempo de execução algo demorado.

Os *SNP's* (*Single Nucleotide Polymorphism*), propostos pela primeira vez por Lander em 1996, foram considerados por Yang *et al.*, (2013), como uma inovação ao nível dos marcadores moleculares e, tal como o seu nome indica, consistem num polimorfismo devido à alteração de um único nucleotídeo. Segundo os mesmos autores, este tipo de polimorfismo inclui transições de base única, transversões, inserções e deleções, sendo as transições as mais frequentes (cerca de 2/3) (Referido em Polido *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

Esta nova tecnologia de marcadores moleculares, por comparação com os tipos clássicos, apresenta marcadores mais numerosos cobrindo por isso todo o genoma, apresentando uma grande estabilidade genética, facilidade de reprodução e elevada precisão, o que permite a automatização do método (Referido em Polido *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

#### **II.4. Miogénese**

Miogénese palavra que deriva do grego e cuja formação elucida sobre o seu significado, mio (*musculo*) e *genesis* (origem).

Durante a fase embrionária desenvolvem-se três camadas celulares, a endoderme, a mesoderme e a ectoderme que são a “fonte” embrionária de células que permitirão a formação dos tecidos e órgãos do novo ser.

As células primordiais da mesoderme permitem a formação da maior parte do tecido muscular e esquelético, para além do sistema circulatório, urinário e reprodutor, iniciando-se a miogénese a partir de um bloco de células mesodérmicas denominadas de somitos e resultando deste processo dois grupos de células, as fibras (células) musculares e um outro de menor dimensão formado por células satélite (Dias Correia & Dias Correia, 2006).

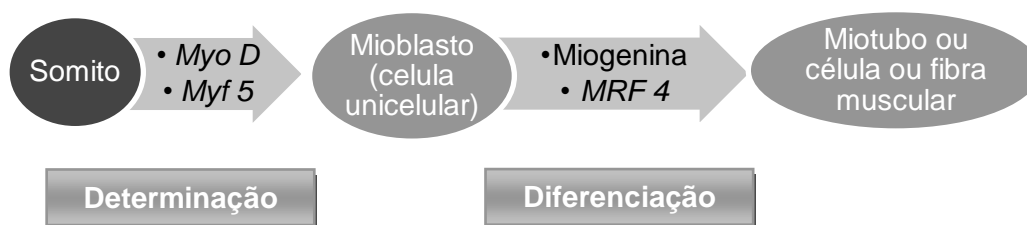
O processo de formação de fibras musculares (Esquema 1) resulta de uma primeira fase em que ocorre a determinação inicial dos somitos em linhagens miogénicas ou seja, ocorre um desenvolvimento dos somitos em células estaminais miogénicas, as quais são designadas por mioblastos. Posteriormente, e numa segunda fase, estas células unicelulares iniciam a fase de proliferação seguindo-se, depois, a fase de diferenciação terminal, onde os mioblastos se unem entre si formando miotubos (fibra muscular) ocorrendo, também, nesta fase a expressão e organização dos produtos genéticos (Dias Correia & Dias Correia, 2006). Contudo, existe um grupo de mioblastos que entra em estado de quiescência, ou fase G0 do ciclo celular (Dias Correia & Dias Correia, 2006), denominado de mioblastos silenciosos ou

células satélite, que a partir de mecanismos de ativação entram em replicação (Reggiani & Kronnie, 1999).

As fibras musculares possuem a particularidade de se manterem diferenciadas ao longo dos anos de forma irreversível, dado que após a fusão dos mioblastos ocorre a paragem do seu ciclo celular. No entanto, estas vão evoluindo consoante a idade dos animais e os seus desempenhos fisiológicos.

A regulação do desenvolvimento músculo-esquelético é da responsabilidade dos genes, regulando-se a miogénese positiva e negativamente. A regulação positiva é realizada por fatores de transcrição como é o caso dos *MRF* (*Myogenic regulator factors*), que incluem genes como *Myo D*, *Myf 5*, miogenina e *MRF 4*. No caso da regulação negativa um dos fatores é a miostatina, *MSTN* (Israels & Israels, 2001. Citado por Dias Correia & Dias Correia, 2006).

Esquema 1 - Evolução e fatores que regulam a miogénese.



Fonte: (Adaptado de Dias Correia & Dias Correia, 2006)

O gene *Myo D*, *myogenic determination gene D*, à semelhança do *Myf 5*, está diretamente relacionado com a determinação das linhagens miogénicas (Israels & Israels, 2001. Citado por Dias Correia & Dias Correia, 2006), desempenhando por isso, um papel fundamental no desenvolvimento muscular (Dias Correia & Dias Correia, 2006). A expressão destes dois genes ocorre nos mioblastos e nos miotubos (Spiller *et al.*, 2002. Citado por Dias Correia & Dias Correia, 2006) podendo, também, ter alguma influência na fase inicial da diferenciação dos mioblastos (Israels & Israels, 2001. Citado por Dias Correia & Dias Correia, 2006).

No caso da miogenina, esta influencia a diferenciação dos mioblastos tornando-se necessária para a formação dos miotubos, ao passo que a *MRF 4* atua ao nível das fases de diferenciação terminal (Spiller *et al.*, 2002. Citado por Dias Correia & Dias Correia, 2006). Quanto à miostatina esta regula negativamente a massa muscular, atuando ao nível do ciclo celular, em especial na transição da fase G1 para S. Atente-se que o ciclo celular é composto por quatro fases sendo a fase G1 o intervalo entre a mitose (fase M) e a fase S, ocorrendo nesta última a síntese de ADN. Por sua vez, alterações no funcionamento do



gene da miostatina originam a hiperplasia ou hipertrofia das fibras musculares (Dias Correia & Dias Correia, 2006).

## **II.5. Gene da Miostatina**

### **II.5.1 Historia**

As primeiras descrições fenotípicas, relacionadas com o agora conhecido gene da miostatina, foram realizadas cerca de 200 anos antes da descoberta do gene, estando até essa data, associadas à hipertrofia muscular nos bovinos ou síndrome do duplo músculo.

A primeira documentação desta matéria foi escrita por George Culley e datava de 1807. Mais tarde, surgiu uma descrição mais detalhada por Kaiser (1888), originando uma nova visão sobre a produção animal associada às características da carcaça (Bellinge *et al.*, 2005).

Anos mais tarde surge uma proposta de Wriedt (1929), quanto à possível origem do duplo músculo: uma alteração num gene simples, acontecendo desenvolvimentos para esta sugestão, somente no ano de 1995, na *Faculty of Veterinary Medicine da University of Liege*, na Bélgica, quando foi mapeada a extremidade centromérica do cromossoma 2 dos bovinos, comprovando-se que a síndrome do duplo músculo se devia a uma alteração genética simples e autossómica (Charlier *et al.*, 1995). O mapeamento foi completado mais tarde, por investigadores do *U.S. Department of Agriculture*, Clay Center, Nebraska (Smith *et al.*, 1997. Citado por <http://www.southdevon-cattle.com.au/myostatin.htm>).

Como consequência do anteriormente descoberto e com o objetivo de identificar o gene responsável pela descrição designada até então como síndrome do duplo músculo, apareceu, pela primeira vez, no ano de 1997, uma outra investigação realizada por McPherron & Se-Jin Lee, na *Johns Hopkins University School of Medicine* em Baltimore, o gene da miostatina, que teve origem numa tentativa efetuada para descobrir os genes responsáveis pelos fatores de crescimento, descobrindo-se um gene através de técnicas de genética molecular, que ainda não tinha sido identificado até à data desta investigação.

Esta investigação revelou, também, que a miostatina é uma proteína composta por 376 aminoácidos e que está especificamente relacionada com a produção de tecido músculo-esquelético em adultos (McPherron *et al.*, 1997. Citado por <http://www.southdevon-cattle.com.au/myostatin.htm>).

Concluída a identificação, a etapa seguinte passou por investigar a função biológica, levada a cabo por McPherron & Se-Jin Lee (1997), revelando que a miostatina regula negativamente o tecido músculo-esquelético.

A forte relação entre as duas investigações, o mapeamento das alterações genéticas em 1995 que comprovou a origem do duplo músculo, e o ensaio realizado por McPherron e a sua equipa em 1997 que permitiu a descoberta e respetiva descrição do gene da miostatina,

originou a análise deste gene na raça bovina Branco Azul Belga, em simultâneo, pelas duas equipas de investigadores, revelando o resultado uma alteração genética na miostatina, nomeadamente, a deleção de 11 pares de bases, que origina o duplo-músculo nesta raça (McPherron *et al.*, 1997; Grobet *et al.*, 1997).

Nos finais dos anos 90 Grobet *et al.* (1998) descreveram novas mutações que envolviam perda de função desta proteína.

No ano de 2003, uma equipa liderada por Susana Dunner, do Laboratório de genética molecular, *Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense* de Madrid, descreveu cinco novas mutações no gene da miostatina, que não causavam alterações fenotípicas nos animais.

Nos últimos anos, têm surgido alguns artigos de revisão relacionados com este assunto, continuando a desenvolverem-se as investigações sobre as diversas mutações nas várias raças.

### **II.5.2 Localização e função biológica**

O cariotipo dos bovinos é formado por 60 cromossomas, 2 destes cromossomas são sexuais ou gonossomas e os restantes 58 são autossomas (i.e. 29 pares de autossomas).

O gene da miostatina (*GDF-8*) encontra-se situado no cromossoma 2 dos bovinos, levando, por sua vez, a que cada célula possua duas cópias deste. No ser humano, este gene encontra-se, igualmente, situado no cromossoma 2, mas nos suínos encontra-se no cromossoma 15, no frango no cromossoma 7 e no rato no cromossoma 1 (Chelh *et al.*, 2009).

Nas numerosas espécies onde este gene já foi descrito, é sempre visível uma característica comum, a presença de 3 exões e 2 intrões (Chelh *et al.*, 2009). A miostatina é uma proteína sintetizada nos músculos do esqueleto na forma de um pro-péptido. (McPherron & Lee, 1996; Thomas *et al.*, 2000. Citado por Dias Correia & Dias Correia, 2006) encontrando-se em diversos tecidos músculo-esqueléticos, no coração e na glândula mamária entre outros (Ji *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 1999. Citado por Dias Correia & Dias Correia, 2006).

A designação mh é a mais usual de entre uma variedade de símbolos para denominar o alelo responsável pela hipertrofia muscular enquanto o símbolo +, representa o fenótipo normal.

A função biológica prende-se com a inibição do desenvolvimento muscular traduzindo-se numa regulação negativa deste e expressando-se mais acentuadamente nos estados embrionários e fetais e mais reduzidamente no tecido muscular adulto (Thomas *et al.*, 2000. Citado por Dias Correia & Dias Correia, 2006), contribuindo, também, para a manutenção da homeostasia dos tecidos nos animais vertebrados adultos. Por este motivo, a miostatina foi incluída na *superfamília TGF- $\beta$ , Transforming Growth Factor Beta superfamily* que envolve

um grande número de fatores de crescimento e diferenciação (McPherron & Lee, 1997) e foi, inicialmente, denominada por *Fator de Crescimento Diferencial – 8, GDF-8*.

A descoberta do gene da miostatina por McPherron & Lee (1997) foi obtida após realização de um ensaio na espécie *mus musculo* (rato comum) que demonstrou que, ao ser bloqueada a atividade do *GDF-8* existia um aumento significativo na massa muscular dos animais, devido ao aumento do número de fibras musculares, mas sem aumento da quantidade de gordura, contrariamente ao que aconteceu nos animais considerados normais (sem bloqueio da atividade do gene). Para além disso, verificou-se que o peso individual dos músculos dos animais com o bloqueio do gene era o dobro, comparativamente com o peso dos músculos dos animais normais.

Tendo por base este estudo, os mesmos investigadores, compararam o alinhamento da sequência de aminoácidos da miostatina em 10 espécies diferentes, o que permitiu verificar o elevado grau de conservação da sequência entre espécies na região terminal-C da proteína (terminal carboxilo). Foi, assim, possível concluir que, apesar de se estar perante espécies diferentes, a função biológica é bastante idêntica entre estes, levando, consequentemente, a que fossem observadas, também, parecenças fenotípicas entre as espécies.

Com este estudo, foi questionada a possibilidade de as mutações no gene da miostatina estarem ligadas ao aparecimento do duplo músculo nas raças bovinas.

### **II.5.3 Duplo Músculo**

A designação de síndrome do duplo músculo apareceu, no início do século XIX, como consequência da exuberância muscular notada em alguns animais de diferentes raças bovinas.

Esta característica permaneceu envolta nalguma controvérsia, no que respeita à sua hereditariedade, pois segundo Ménissier (1982), existiam diversos modelos contraditórios entre si (Grobet *et al.*, 1998).

A origem fisiológica do duplo músculo é já, atualmente, conhecida. Sabe-se que as grandes massas musculares, mais proeminentes na região proximal e nos quartos traseiros, resultam de uma hiperplasia muscular, aumento do número de fibras musculares, conjuntamente com uma hipertrofia muscular, aumento do tamanho das fibras musculares, apresentando esta última menos influencia no resultado fenotípico (Bellinge *et al.*, 2005). Conhece-se, ainda, que a hiperplasia afeta, em primeiro lugar, os músculos superficiais (Charlier *et al.*, 1995).

Como resultado das origens fisiológicas passou, também, a utilizar-se estas duas designações para denominar a dupla musculatura, surgindo estas alterações fisiológicas em consequência de mutações que ocorrem no gene da miostatina, podendo ser diferentes

entre raças. De acordo com a simbologia do gene mutante, *mh* (*muscular hypertrophy*), os três genótipos que podem surgir são apresentados como *mh/mh*, *mh/+* e *+/+*.

Associadas a estas duas causas fisiológicas surgiram outros problemas, tendo alguns levado a alterações características dos animais com esta síndrome. As principais alterações fenotípicas ocorrem ao nível das massas musculares, da massa óssea e, também, do teor de gordura nos tecidos, surgindo ainda outras alterações nestes animais, comparativamente com os animais normais, embora sejam mais variáveis entre indivíduos, género e raça, podendo, mesmo, ser influenciadas pela alimentação e que passam por alterações fisiológicas e comportamentais, problemas reprodutivos e de crescimento e, ainda, alterações na carcaça.

Ao nível da massa muscular, os bovinos sofrem um aumento de pouco mais de 20%, devendo-se este às duas principais causas do duplo músculo (McPherron & Lee, 1997), não se apresentando este aumento uniforme e expressando-se com maior proeminência na região proximal frontal e nos quartos traseiros (Menissier, 1982. Citado por Bellinge *et al.*, 2005).

Para além destas variações musculares os bovinos têm, ainda, uma elevada percentagem de fibras brancas, bem como uma reduzida quantidade de colagénio. Por oposição ao aumento de massa muscular, estes animais apresentam uma percentagem menor de massa óssea e de teor de gordura nos tecidos. A massa óssea, relativamente aos animais normais, tem uma redução de cerca de 10% que é originada por uns ossos de menor comprimento, mais finos e por uma menor densidade óssea (<http://www.southdevon-cattle.com.au/myostatin.htm>).

O hipodesenvolvimento dos tecidos adiposos é causado por uma diminuição do volume das células adiposas provocando um menor marmoreado na carcaça e menor teor de gordura intramuscular sofrendo, também, a composição da matéria gorda alterações (Hanset, 1991. Citado por Bellinge *et al.*, 2005). O teor de gordura polinsaturada é mais do dobro nos animais com a síndrome, por oposição aos indivíduos normais (Hocquette *et al.*, 1999. Citado por Bellinge *et al.*, 2005).

As diversas mutações, a que está associada a dupla musculatura, fazem com que as características fenotípicas possam ter algumas diferenças entre si, a variação existente nos problemas fisiológicos e comportamentais surgem destas diferentes mutações, passando por uma redução do metabolismo aeróbio no músculo (Menissier, 1982. Citado por Bellinge *et al.*, 2005), e por uma dificuldade no transporte de oxigénio provocando fadiga mais rapidamente, quando os animais são expostos a esforço físico (Holmes *et al.*, 1973. Citado por Bellinge *et al.*, 2005). Por outro lado, a quantidade de alimento ingerida é menor havendo uma melhoria no índice de conversão alimentar. Outra das desvantagens prende-

se com o facto de haver maior suscetibilidade a doenças respiratórias (Hanset, 1991. Citado por Charlier *et al.*, 1995).

Os problemas reprodutivos e de crescimento associados podem ser diversos, a redução da fertilidade, uma maior incidência de distocia e um aumento na taxa de mortalidade dos vitelos, principalmente nos partos não assistidos, acontecendo estes dois últimos por um maior peso dos vitelos ao nascimento, por comparação com os normais (Referido em Bellinge *et al.*, 2005). A redução da produção leiteira, é outra das desvantagens que surge nas fêmeas com duplo músculo (Hanset, 1991. Citado por Charlier *et al.*, 1995).

As alterações no crescimento estão relacionadas com o facto de, nos animais com mutação, o nível da hormona de crescimento no plasma sanguíneo ser mais baixo do encontrado nos animais em que não existe sinais da mutação. (Michaux *et al.*, 1992. Citado por Bellinge *et al.*, 2005)

Em consequência das características músculo esqueléticas, os animais que possuem a dupla musculatura têm uma carne mais tenra e mais pálida, devido a um baixo teor em colagénio e a uma maior quantidade de fibras rápidas glicolíticas (fibras brancas ou com menor teor de hemoglobina) (Bailey *et al.*, 1982; Hanset *et al.*, 1982. Citado por Chelh *et al.*, 2009).

Figura 5 - Touro da raça Branco Azul Belga com a síndrome do duplo músculo e genótipo mh/mh.



Fonte:

[https://www.awenet.be/awe/commun/commercial/bbb/catalogue\\_mixte.php](https://www.awenet.be/awe/commun/commercial/bbb/catalogue_mixte.php)

exibe-se de forma mais ou menos exuberante, dependendo do tipo de mutação, e se o animal apresenta uma ou duas cópias do alelo da hipertrofia muscular mh, sabendo-se, ainda, que as mutações do gene ocorrem na zona conservada da proteína (McPherron & Lee, 1997).

Atualmente, são conhecidas mais de uma dezena de mutações, no entanto, a sua maioria são mutações silenciosas.

#### II.5.4 Mutações nas diferentes raças.

A dupla musculatura está presente em diferentes raças bovinas e em outras espécies animais, estando a raça bovina Branco Azul Belga (BBB) (Figura 5) entre as mais estudadas e onde foi feita a homologia entre bovinos, o gene da miostatina e o locus mh, inicialmente, encontrado nos ratos.

À semelhança do que se passa em outras mutações genéticas e dado que estamos perante uma característica recessiva esta apresenta, também, diferentes níveis de intensidade ou seja,

A mutação no gene da miostatina, detetada na raça pioneira *BBB*, encontra-se situada no terceiro exão e tem origem numa deleção de 11 pares de bases, com início no nucleótido 821 e término no nucleótido 831, inclusive. Consequentemente, esta mutação é referida como nt821 (del11), ocorrendo numa zona altamente conservada nos membros da família *TGF- $\beta$* , zona bioativa do terminal carboxilo (C-terminal), prendendo-se os efeitos provocados, com uma alteração na estrutura da proteína e um prematuro aparecimento do codão stop (Grobet *et al.*, 1997). É nesta raça e nesta mutação que se têm verificado efeitos mais significativos, principalmente nos animais homozigotos para a mutação, no entanto, esta não é exclusiva da raça *BBB*, segundo Georges *et al.* (1998) estando presente, também, na raça espanhola Asturiana dos Vales (Referido em Bellinge *et al.*, 2005).

Outro tipo de mutação surge nas raças Piedemontesa e Gascone, onde ocorre uma troca de nucleótidos ou seja, dá-se a substituição de uma guanina por uma adenina (G→A) provocando esta transição, subsequentemente, uma alteração no aminoácido existente inicialmente e dando-se, assim, a substituição de uma cistina por uma tirosina que ocorre na região conservada do gene. É conhecida por C313Y (G→A) ocorrendo a troca no nucleótido 938 do exão 3 provocando uma alteração na estrutura e no funcionamento da proteína, dado que, neste caso específico a cistina que é substituída é a quinta de um grupo de nove resíduos de cistinas típico e altamente conservado nos membros da família *TGF- $\beta$*  (Grobet *et al.*, 1998).

É na raça italiana Marchigiana que se encontra outra das principais mutações existentes no gene da miostatina, a E291X (G→T) que ocorre no nucleótido 824 do exão 3 resultando, tal como a anterior, de uma transição de nucleótidos. Desta vez a troca processada é a de uma guanina para uma timina (G→T) levando, por sua vez, à alteração do aminoácido inicial para um antecipado aparecimento do codão stop, o que provoca um incorreto funcionamento da proteína (Grobet *et al.*, 1998).

O aparecimento conjunto de uma deleção e de uma inserção no exão 2, foi identificado como nt419 (del7-ins10) podendo, aparentemente, não estar relacionados. Esta mutação, tem início no nucleótido na posição 419, verificando-se uma deleção de 7 pares de bases e uma posterior inserção de 10 pares de bases o que leva, tal como as anteriores, a um aparecimento precoce do codão stop no terminal-amino (N-terminal), associando-se o seu aparecimento à raça Main-Anjou (Grobet *et al.*, 1998).

No segundo exão, são conhecidas duas mutações por substituição de pares de base, a Q204X (C→T), transição de uma citosina para uma timina (C→T) no nucleótido na posição 610, e a E226X (G→T) transição de uma guanina para uma timina (G→T) no nucleótido 676, resultando a consequência de ambas as mutações num prematuro aparecimento do codão stop, novamente no N-terminal e estando esta troca associada, respetivamente, ao aminoácido 204 e 226. A mutação Q204X (C→T) é específica da raça francesa Charolesa,

enquanto a mutação E226X (G→T) a par da nt419 (del7-ins10) está presente na raça Main-Anjou (Grobet *et al.*, 1998).

Contrariamente às já referidas a mutação identificada como nt414 (C→T) é uma mutação silenciosa aparecendo, maioritariamente, associada a outras mutações em diversas raças, aparecendo esta transição no codão 138 e ocorrendo a substituição da citosina na terceira posição deste (Grobet *et al.*, 1998).

A última das mutações, a mais relevante e sobre a qual vai incidir este trabalho, é específica da raça francesa Limousine identificada pela primeira vez na Austrália a F94L (C→A) resulta de uma transição de uma citosina para uma adenina (C→A) provocando, consequentemente, uma mudança no aminoácido à qual pertencem estas bases verificando-se a substituição de uma leucina por uma fenilalanina. A transição ocorre no nucleótido 433 estando o aminoácido, respetivo, localizado na posição 94 e surgindo na região conservada N-terminal encontrando-se o seu nome associado à localização do aminoácido, como na maioria das mutações descritas (Esmailizadeh *et al.*, 2008).

Para além das mutações anteriormente descritas, existem outras que, contrariamente às anteriores, foram identificadas nos intrões do gene da miostatina (Dunner *et al.*, 2003).

### **II.5.5 A mutação do Limousine – F94L**

Apesar da mutação no gene da miostatina, F94L, estar associada, maioritariamente, à raça bovina Limousine foi igualmente demonstrada a sua presença noutras raças, embora com menor frequência (Sellick *et al.*, 2007. Citado por Esmailizadeh *et al.*, 2008). A descoberta foi feita por investigadores da *Adelaide University in Australia* e a equipa liderada por Pitchford (<http://limousin.co.uk/category/f94l-profit-gene/>).

Atualmente, esta mutação foi, já, identificada em animais de diversos países onde existe forte presença desta raça, como a Austrália, os Estados Unidos da América, a França, entre outros desenvolvendo-se vários estudos de forma a identificar os efeitos desta nova variante genética, que permitiram concluir que esta atua a nível fenotípico de uma forma intermédia, relativamente aos animais sem qualquer alteração no gene e à forma mais significativa da síndrome do duplo músculo, a inativação do gene da miostatina, que ocorre na raça *BBB*.

Deste modo, a variante F94L pode ser utilizada como uma característica melhoradora em bovinos, contornando os problemas de distocia e morte embrionária verificados nos casos mais significantes, dado não afetar o peso ao nascimento, nem a área pélvica, dois fatores influentes nestes problemas. Para além destas características reprodutivas a mutação F94L não influencia, também, o peso da massa óssea.

No que concerne à massa muscular a situação apresenta-se diferente da verificada nas características reprodutivas, revelando os estudos efetuados a existência de um aumento da massa muscular, que por sua vez se converte num aumento do peso da carne da carcaça.

Esmailizadeh *et al.*, 2008 verificaram ambos os efeitos, de dominância e aditivo, do alelo F94L em diversas características relacionadas com o peso e a massa muscular observando que os animais homozigotos para a mutação apresentam maior aumento da massa muscular.

Esta substituição de nucleótido leva, ainda, a uma redução na espessura da camada adiposa, tanto no animal como na carcaça, do conteúdo de gordura intramuscular e no peso total de gordura na carcaça.

A qualidade da carne é um grupo de características bastante afetadas nos animais *BBB* com a mutação nt821 no entanto, os estudos realizados na carne dos animais portadores da mutação F94L, não revelaram qualquer efeito na tenrura, no valor de pH, nem registo de percas no músculo *longissimus dorsi* quando submetido à operação de cozedura da carne.

Ressalva-se que os resultados mencionados provêm de ensaios (Esmailizadeh *et al.*, 2008) realizados em animais existentes na Austrália e Nova Zelândia que resultaram de cruzamentos entre a raça Limousine e Jersey, tornando-se possível a existência de alguma variação em relação aos animais puros da raça Limousine.



### III. Material e Métodos

Em Portugal e noutros países do mundo, ao longo dos últimos anos, têm vindo a ser realizados estudos com o propósito de identificar alterações no gene da miostatina (*GDF-8*) em diferentes raças de bovinos.

Na sequência destes trabalhos e, por iniciativa da Associação Portuguesa de Criadores da Raça Bovina Limousine (ACL), surgiu o interesse de realizar um estudo sobre o efetivo nacional desta raça, selecionando-se machos reprodutores, fêmeas adultas e alguns descendentes dos machos escolhidos.

O trabalho laboratorial deste estudo foi realizado no Laboratório de Genética Molecular (LGM) da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Biotecnologias e Recursos Genéticos, localizado no Polo de Investigação da Fonte Boa, antiga Estação Zootécnica Nacional, pertença do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, INIAV.

#### III.1. Animais

Os animais incluídos no estudo (Tabela 2) encontram-se divididos em duas categorias: reprodutores e respetivos descendentes. No que concerne ao grupo dos reprodutores este é formado por machos, aleatoriamente selecionados dos cerca de 200 touros ativos em Portugal, e uma fêmea adulta necessária ao estudo, por uma questão de confirmação do genótipo. No grupo dos descendentes encontram-se, machos e fêmeas, filhos dos touros selecionados.

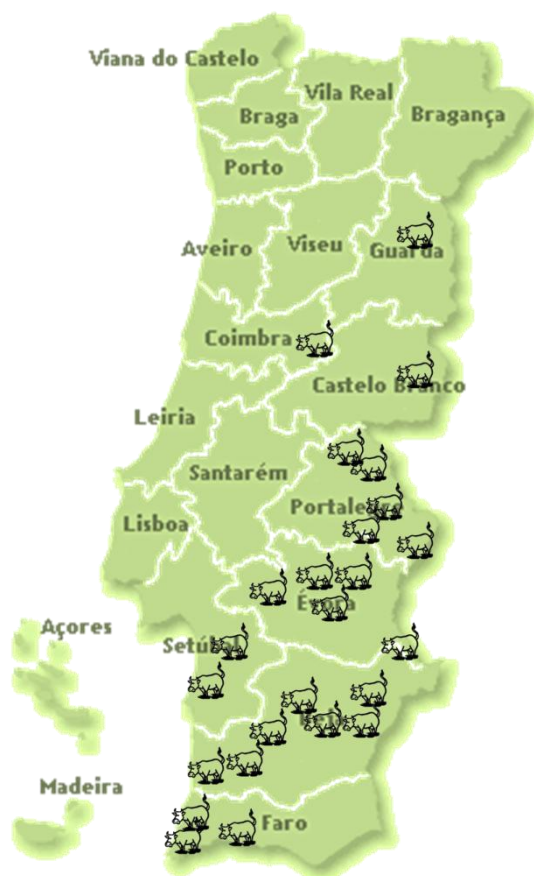
Inicialmente incluíram-se apenas machos reprodutores no entanto, mais tarde, em consequência dos resultados obtidos foi selecionada uma fêmea adulta e descendentes.

Todos os animais envolvidos encontram-se inscritos no Livro Genealógico da raça Limousine e são propriedade de criadores pertencentes à ACL. Os animais pertencem atualmente a explorações localizadas em Portugal, ainda que alguns tenham origem em Espanha e França (Figura 6).

Tabela 2 - Distribuição por categorias dos animais genotipados

N.º de machos reprodutores	N.º de fêmeas adultas	N.º de descendentes	Total de animais
69	1	12	82

Figura 6 - Localização dos animais genotipados



### III.2. Análise Laboratorial<sup>1</sup>

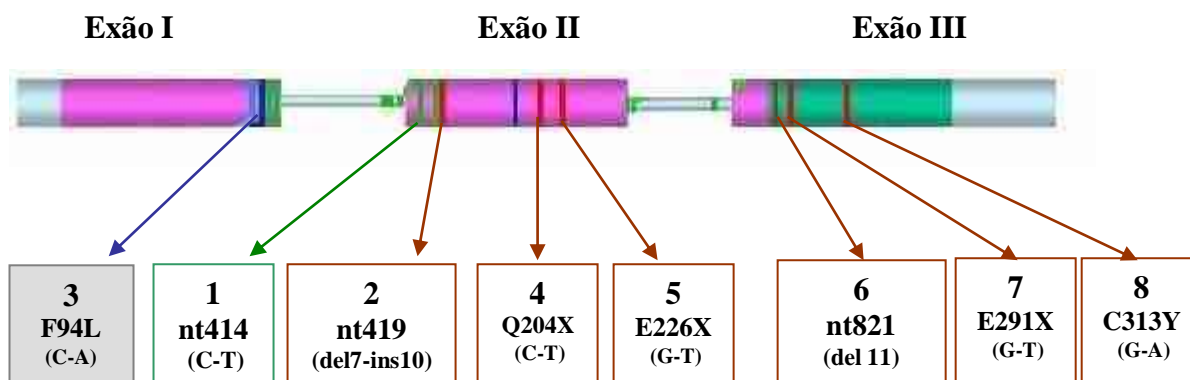
A análise laboratorial foi realizada com o objetivo de identificar algumas das mutações existentes no gene da miostatina, delineando-se esta após uma pesquisa bibliográfica com o intuito de eleger as mutações a analisar, para além da mutação específica da raça bovina limousine (F94L), selecionou-se as que se esperavam ser mais frequentes, de entre os diversos estudos já realizados, Grobet *et al.* (1998), Esmailzadeh *et al.* (2008) e Dunner *et al.* (2003).

O gene da miostatina, gene *GDF-8*, é constituído por três exões, encontrando-se as mutações selecionadas por eles distribuídas e estando apresentadas na figura 7.

---

<sup>1</sup> Ao longo de toda a análise laboratorial, todas as amostras encontraram-se, sempre, devidamente, identificadas.

Figura 7 - Esquema representativo do gene da miostatina com a localização respectiva de cada uma das mutações selecionadas.

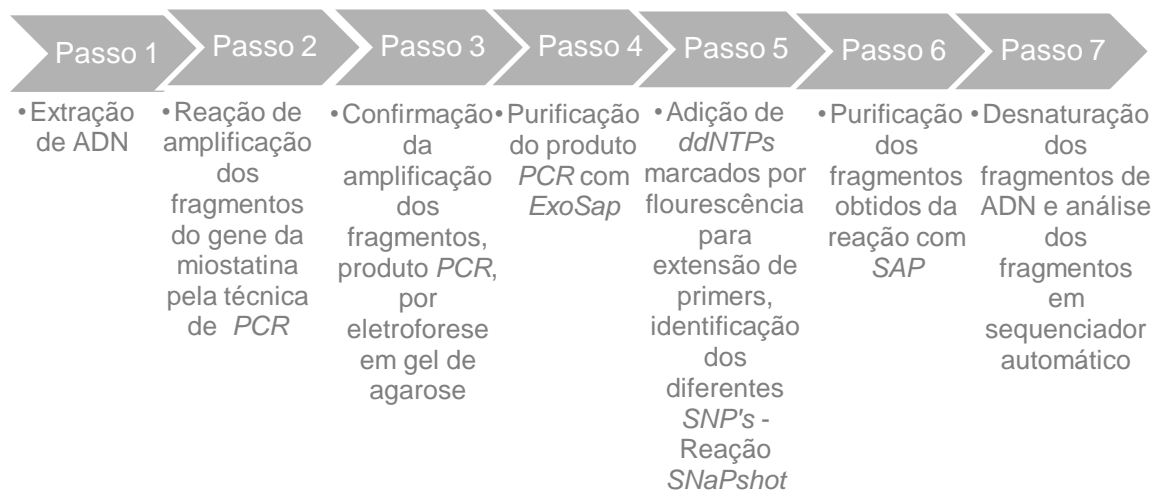


Fonte: Adaptado de Grobet *et al.* (1998)

Com vista à identificação dos polimorfismos de cada mutação, foi utilizada a metodologia desenvolvida no LGM – Fonte Boa, recorrendo-se ao método de *SNaPshot*, desenvolvido pela empresa Applied Biosystems (ABI Prism SNaPshot, #4323154), que pressupõe a utilização de *primers* adjacentes a cada mutação efetuando-se a genotipagem em sequenciador automático.

A identificação dos polimorfismos exige várias etapas, que se mencionam no passo-a-passo do esquema 2;

Esquema 2 - Passo-a-passo da genotipagem de *SNP's*



Houve o cuidado de garantir que todos os procedimentos laboratoriais isentassem as amostras de qualquer tipo de contaminação, cumprindo-se todas as normas de segurança e de trabalho de um laboratório de genética molecular.

### III.2.1 Material Biológico

O material biológico foi escolhido de acordo com a natureza do estudo e recaiu no sangue, em virtude de poder ser recolhido em machos e fêmeas, o que seria impossível caso se optasse pelo sêmen, e de ser menos suscetível a contaminações, como é o caso do uso dos pelos para extração de ADN. O sangue foi recolhido em tubos de plástico a vácuo de 4ml, esterilizados e contendo anticoagulante, *EDTA*.

Realizou-se uma recolha por animal, a qual foi devidamente identificada com o SIA, nome do animal e criador a que pertence. Para garantir a inalteração do sangue recolhido, procedeu-se à refrigeração deste ainda em campo congelando-se, posteriormente, a  $-18^{\circ}\text{C}$ . A conservação em laboratório fez-se, também, através de congelação.

Dado existir a necessidade de se simplificar a identificação de cada uma das amostras, durante a atividade laboratorial, atribuiu-se por cada número SIA um número interno que acompanhou a amostra até conclusão do processo.

### III.2.2 Extração de ADN

Existem no mercado diversos *kit's* comerciais para a extração de ADN, podendo-se optar de acordo com o tipo de material biológico que se pretende utilizar. Neste caso decidiu-se optar pelo *Gentra® Puregene® Blood Kit* do grupo *Quiagen®* realizando-se, com este *kit*, a extração e utilizando os reagentes que o compõem, encontrando-se descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Composição do *Gentra® Puregene® Blood Kit*

<b><i>RBC Lysis Solution</i></b>
<b><i>Cell Lysis Solution</i></b>
<b><i>RNase A Solution</i></b>
<b><i>Protein Precipitation Solution</i></b>
<b><i>DNA Hydration Solution</i></b>

Para todo o processo de extração seguiu-se o protocolo que acompanha o *kit*. No entanto, antes de se dar início à extração e dado que as amostras de sangue se encontravam a uma temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ , foram previamente descongeladas à temperatura ambiente.

Os reagentes acima mencionados foram responsáveis por cada uma das fases que envolveu o processo de extração.

A extração de ADN, que teve como objetivo inicial a promoção da lise celular, necessitando para a sua ocorrência de dois dos reagentes incluídos no *kit*, realizou-se usando 300  $\mu\text{l}$  de sangue, que foram colocados num tubo *Eppendorfe* de 2ml.

Após a adição de *RBC Lysis Solution* e depois de se ter procedido à centrifugação, foi possível obter o *pellet* de glóbulos brancos desprezando o sobrenadante, concluindo-se a reação da lise celular com a adição de *Cell Lysis Solution*.

Depois de lisar as células tornou-se necessário libertar o ADN do ARN, utilizando-se uma enzima digestiva, *RNase A Solution*, para fazer a reação. As amostras foram incubadas a 37°C e, posteriormente, arrefecidas em gelo tornando mais fácil o passo seguinte: a precipitação proteica, que se realizou com o objetivo de alcançar um ADN final o mais purificado possível, utilizando-se a *Protein Precipitation Solution*. Após a adição, desta solução, e posterior centrifugação das amostras verificou-se uma solução heterogénea de flocos de cor castanho-escuro, que correspondeu à proteína precipitada de onde se extraiu o sobrenadante para um tubo *Eppendorf* agora de 1,5ml. O sobrenadante extraído continha, somente, o ADN, procedendo-se com esta solução à precipitação do mesmo, utilizando para isso isopropanol a 100%, que se encontrava a uma temperatura de -20°C. Finalizada a reação de precipitação do ADN foi possível visualiza-lo como um *pellet* branco.

Retirado o sobrenadante da solução e com a finalidade de lavar o ADN adicionou-se etanol a 70%, desprezando-se o sobrenadante após a operação de lavagem e depois de centrifugada a solução.

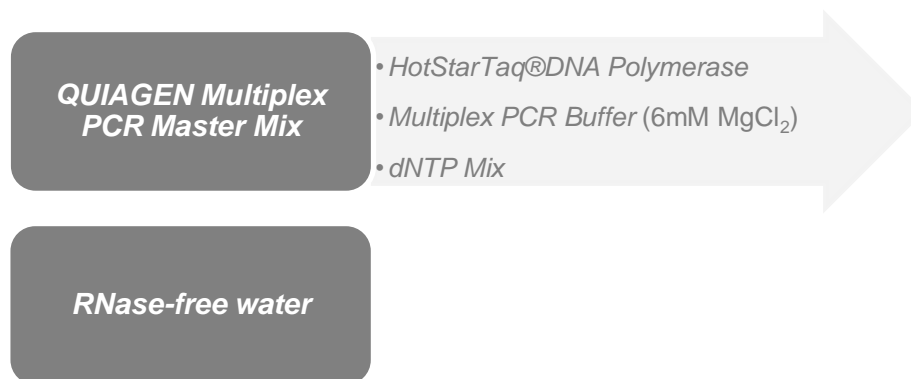
Com vista à finalização da extração adicionou-se *DNA Hydration Solution*. Ao dissolver-se o ADN nesta solução procedeu-se, também, à sua hidratação, ocorrendo este processo durante aproximadamente 12 horas à temperatura ambiente.

Concluído o processo de extração de ADN, este foi armazenado a 4°C até se verificar o próximo passo - a realização da reação de amplificação dos fragmentos do gene da miostatina através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*).

### **III.2.3 Reação de amplificação dos fragmentos do gene da miostatina através da técnica de *PCR***

A amplificação dos fragmentos pretendidos realizou-se através da técnica de reação em cadeia da polimerase (*PCR*), e a sua aplicação fez-se usando o *QUIAGEN® Standard Multiplex PCR Kit*, do grupo QUIAGEN®. Com este *kit* são fornecidos alguns dos reagentes necessários à realização da *PCR*, os quais são apresentados no Esquema 3.

Esquema 3 - Componentes do QUIAGEN® Standard Multiplex PCR Kit



O princípio bioquímico da técnica de *PCR*, baseia-se na amplificação da cadeia de ADN *in vitro*, permitindo amplificar, somente, a sequência pretendida um número indefinido de vezes. Esta amplificação ocorre na presença de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores), de uma solução tampão de magnésio, que auxilia a amplificação *PCR*, de uma Taq polimerase, de *dNTP*'s (trifosfatos de desoxirribonucleoídeos) e de *RNase-free water*, à qual foi adicionado o ADN extraído.

Os *primers* são oligonucleotídeos sintetizados quimicamente, que servem como molde para a síntese da sequência de ADN que se pretende amplificar. A *PCR* envolve várias fases, iniciando-se na desnaturação da cadeia de ADN através da ação do calor a 95°C, seguida da fase de *annealing*, na qual estas cadeias emparelharam com os *primers*.

A Taq polimerase sintetiza os segmentos unifilamentares de ADN a partir do *primer*, polimerização das novas cadeias de ADN, apresentando um comportamento especial pois é capaz de sobreviver a temperaturas elevadas, o que é fundamental dadas as temperaturas a que ocorre a reação *PCR*. Esta síntese é feita utilizando trifosfatos de desoxirribonucleoídeos, *dNTP*, “peças” estas que serão utilizadas para completar a sequência.

### III.2.4 Preparação e Execução da reação *PCR*

Tal como já referido, para realizar a reação *PCR* é necessário conhecer a sequência que se pretende amplificar. De acordo com o descrito na revisão bibliográfica deste trabalho, o gene da miostatina, no qual se pretende identificar as mutações existentes para a raça limousine, encontra-se no cromossoma 2, estando as mutações em estudo presentes nos três exões que este possui (figura 1).

Dado este facto, para preparação da reação *PCR*, foi necessário utilizar três pares de *primers* que flanqueassem a região onde se encontram as mutações, a fim de serem apenas estas as regiões amplificadas durante a reação *PCR*.

Procedeu-se, desde logo, a uma pesquisa no *GenBank*, por forma a escolher a sequência a utilizar optando-se pela AF320998 *Bos Taurus myostatin (GDF8) gene, complete cds*, que possui 6691 pares de bases (bp).

Os três pares de *primers* foram selecionados de Grobet *et al* (2000) procedendo-se, posteriormente, à adaptação das respetivas localizações à sequência AF320998.

A tabela 4 apresenta os três pares de *primers* (*forward* e *reverse*) sintetizados pela empresa BioPortugal, e adquiridos na forma liofilizada, com uma concentração de 10 nmol, sendo por isso necessário proceder à sua hidratação. Esta foi obtida através da adição de água ultrapura por forma a alcançar uma concentração final de 100pmol/μl, obtendo uma alíquota “stock”.

Tabela 4 - *Primers* utilizados para a reação PCR

Exão	<i>Primer forward</i> 5'→3'	<i>Primer Reverse</i> 5'→3'
I	ATT CAC TGG TGT GGC AAG TTG TCT CTC AGA	CCC TCC TCC TTA CAT ACA AGC CAG CAG
II	GTT CAT AGA TTG ATA TGG AGG TGT TCG	ATA AGC ACA GGA AAC TGG TAG TTA TT
III	GAA ATG TGA CAT AAG CAA AAT GAT TAG	ATA CTC WAG GCC TAY AGC CTG TGG T

Posteriormente foram criadas alíquotas de trabalho, com 50μl de volume, as quais incluíram o *primer forward* e *primer reverse* de cada exão, numa proporção de 1:1, com uma concentração de 20pmol/μl, utilizando-se para a realização destas diluições, a equação 3.

Equação 3 - Expressão utilizada para o cálculo de diluição de soluções

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

Onde  $V_i$  representa o volume inicial da solução,  $C_i$  a concentração inicial da solução,  $V_f$  o volume final da solução que se pretende obter e  $C_f$  a concentração final da solução que se pretende obter.

Tomando como referência, as concentrações dos componentes, bem como os respetivos volumes utilizados para a reação que são sugeridas pelo protocolo do *kit* para um volume de 50μl/amostra, foi efetuada uma adaptação para um volume total de 12,5μl/amostra, conforme referenciado na tabela 5.

Tabela 5 - Volumes por amostra utilizados na preparação da reação *PCR*

Volume/amostra (µl)	
<i>Mix Multiplex</i>	6
<i>Mix Primers</i>	1
<i>RNase-free water</i>	3,5
ADN	2
<b>Total</b>	<b>12,5</b>

Realizou-se a preparação da *Mix de Primers*, num tubo *Eppendorf* de 1,5ml, calculando-se a quantidade a adicionar de cada alíquota de *primers*, para que a concentração final de cada *primer* correspondesse a 0,2µM (0,2pmol/µl) na reação *PCR*.

Após a *Mix de Primers* estar concluída, adicionou-se num tubo *Eppendorf* de 1,5ml *Mix Multiplex*, *Mix de Primers* e *RNase-free water*, na quantidade mencionada na tabela 5 para cada reagente, homogeneizando-se, posteriormente, a solução no vortex.

Colocou-se, então, em tubos *PCR* de 0,2ml de volume, 10,5µl de solução por cada amostra, realizando-se todo este processo dentro da câmara de fluxo laminar com lâmpadas UV, por forma a garantir que não existissem contaminações por outros fragmentos de ADN. Por fim, adicionou-se, ao respetivo tubo *PCR*, 2µl de ADN de cada amostra.

Por forma a garantir a viabilidade de toda a análise, criou-se um controlo negativo por cada lote de amostras analisado, seguindo estas para o termociclador (Applied BioSystems, 9700 GeneAmp) depois de devidamente preparadas. O termociclador foi programado segundo o protocolo, do qual fazem parte as etapas mencionadas na tabela 6;

Tabela 6 - Programa do termociclador utilizada para a reação *PCR*

Fase	Tempo	Temperatura
<i>Initial heat activation</i>	15min	95°C
<i>Denaturation</i>	30s	94°C
<i>Annealing</i>	90s	60°C
<i>Extension</i>	90s	72°C
<i>Final extension</i>	10min	72°C

Na fase de “*Initial heat activation*”, ocorreu a ativação da *HotStarTaq®DNA Polymerase* pelo calor, seguindo-se a fase *denaturation*. O emparelhamento dos *primers* verificou-se na fase “*annealing*”, ocorrendo a “*extension*” por adição de *dNTP*’s. Estas três fases repetem-se por 30 ciclos. Após a fase “*final extension*”, o termociclador mantém-se a uma temperatura de conservação de 4°C.



### III.2.5 Confirmação da amplificação dos fragmentos, produto *PCR*, por eletroforese em gel de agarose

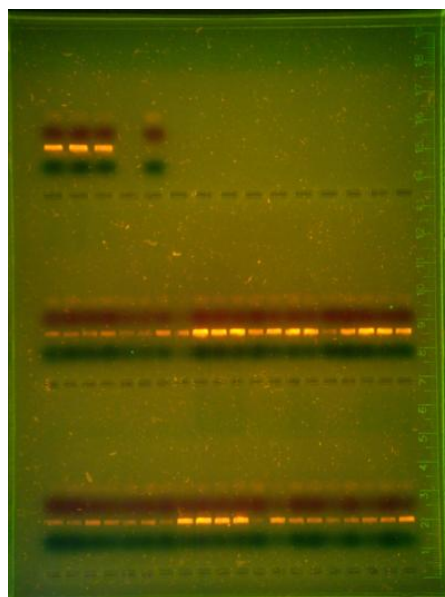
Após a conclusão da reação de amplificação dos fragmentos dos três exões, e com o objetivo de se verificar a ocorrência de amplificação, realizou-se um processo simples de confirmação da amplificação por eletroforese em gel de agarose. Com este método pretendeu-se conferir a quantidade e a qualidade dos fragmentos de ADN amplificados, não dando continuidade à análise laboratorial das amostras que, por razões diversas, não tenham sido amplificadas corretamente. Nestes casos é novamente repetida a reação *PCR*.

Assim, procedeu-se à elaboração do gel de agarose a 2%, utilizando-se o reagente TAE (Tris-acetato EDTA) para o gel e, consequentemente, para a tina de eletroforese.

Desta forma, preparou-se um gel de agarose em que a mistura realizada foi de 200ml de TAE, com 4g de agarose e 2µl de brometo. Concluída a mistura foi colocada no suporte, com os pentes necessários, aguardando-se até solidificar.

Posteriormente, o suporte com o gel foi colocado na tina de eletroforese e os pentes retirados. Os poços foram carregados com 6µl de ADN e 2µl de *Sample Leading Buffer 5x* cada, previamente misturados. A eletroforese decorreu a 100V, durante, aproximadamente, 30 minutos. Terminada, procedeu-se à sua análise onde se observou que os fragmentos amplificados apresentaram as bandas visíveis, ao contrário dos que não foram amplificados como é demonstrado na figura 8.

Figura 8 - Fotografia de um gel de agarose realizado



### III.2.6 Purificação do produto *PCR* com *ExoSap*

Confirmada a amplificação dos fragmentos, a análise laboratorial prosseguiu com a remoção dos *primers* e nucleótidos que não foram utilizados durante a reação *PCR*, utilizando-se uma mistura produzida pela USB Corporation, a *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> (*Exonuclease II/Shrimp Alkaline Phosphatase*), composta por duas enzimas hidrolíticas, uma exonuclease e uma fosfatase alcalina, em que a primeira foi responsável pela remoção de *primers* e de fragmentos de ADN de cadeia simples, ao passo que a segunda teve a capacidade de remover os *dNTP*'s que não foram necessários na reação *PCR*.

Para a realização desta purificação, foram identificados novos tubos *PCR* de 0,2ml onde foi colocado 5µl de produto *PCR*, conjuntamente com 2µl de *ExoSAP-IT*<sup>®</sup>. Salienta-se que este ultimo se encontrava a uma temperatura de -20°C.

Concluída a mistura, as amostras foram introduzidas no termociclador que foi programado segundo o protocolo (Tabela 7).

Tabela 7 - Programa do termociclador utilizado para a reação de purificação *ExoSap*

Fase	Tempo	Temperatura
Incubação	15min	37 °C
Inativação da <b><i>ExoSAP-IT</i></b> <sup>®</sup>	15min	80 °C

Durante a fase de incubação ocorre a purificação do produto *PCR*, inativando-se a *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> através do calor após conclusão da incubação, mantendo-se o termociclador a 4°C por tempo indeterminado, após término do programa.

### III.2.7 Adição de *ddNTPs* marcados por fluorescência para a extensão de *primers*, identificação dos diferentes *SNP's* – Reação *SNaPshot*

A partir do produto *PCR*, purificado com *ExoSAP-IT*<sup>®</sup>, foi possível avançar para o passo seguinte. Nesta fase da análise laboratorial, pretendeu-se identificar os diferentes *SNP's* (*Single Nucleotide Polymorphisms*) que correspondiam às mutações que se desejava reconhecer.

Esta identificação efetuou-se através do *ABI PRISM*<sup>®</sup> *SNaPshot*<sup>™</sup> *Multiplex Kit*, produzido pela Applied Biosystems. A preparação da reação *SNaPshot*, foi realizada com base no protocolo fornecido com o respetivo *kit*, sendo a composição da mistura de reação por amostra a apresentada na tabela 8.

Tabela 8 - Volumes por amostra utilizados para a reação *SNaPshot*.

Volume/amostra (µl)	
<i>Mix SNaP</i>	2,5
<i>Mix Primers</i>	1
Água desionizada	3,5
Produto <i>PCR</i> purificado	3
<b>Total</b>	<b>10</b>

Para a *mix primers* utilizada para este método, e que consiste no conjunto de *primers* adjacentes a cada *SNP*, que se pretende identificar, foi necessário proceder ao desenho destes, de onde resultaram os *primers forward* e *primers reverse*, como é descrito na tabela 9.

Tabela 9 - *Primers* desenhados para a realização da reação *SNaPshot*

Exão	Mutação	Primer Forward 5'→3'	Primer Reverse 3'→5'
<b>I</b>	F94L	-	TCT GGC ATC TCT CTG GAC ATC
<b>II</b>	nt 414	AAG GAA AAC CCA AAT GTT G	-
	nt 419	-	AGT TTA TTG TAT TGT ATC TTA GAG CTA
	Q204X	CCA GGC ACT GGT ATT TGG	-
	E226X	-	ATT CTC ATC TAA AGC TTT GAT TT
<b>III</b>	nt 821	AT TTT GGG CTT GAT TGT GA	-
	E291X	TTA CCC TCT AAC TGT GGA TTT T	-
	C313Y	-	TTT TGC AAA AAT ACA AAT TCA

Fonte: Dados não publicados de Carolino, I. (2013)

A ação de identificação é auxiliada por uma polimerase, *AmpliTaq® DNA Polymerase*, que tem a função de distribuir os *ddNTP's* (didesoxirribonucleótidos trifosfato) pelos fragmentos da cadeia de ADN. O funcionamento desta reação, embora semelhante à reação *PCR*, apresenta algumas diferenças pois o *primer* termina na base imediatamente anterior ao *SNP*, servindo de indicador do local onde deve ser emparelhado os *ddNTP's* marcados por flourocromos. Dado que, posteriormente, os resultados desta identificação irão ser analisados, é apresentada na tabela 10 a correspondência entre os *ddNTP's* e a respetiva cor emitida.

Tabela 10 - Cor emitida pelos flourocromos dos respectivos *ddNTP's*

<i>ddNTP</i>	Flourocromo	Cor emitida
<b>A</b>	dR6G	Verde
<b>C</b>	dTAMRA™	Preto
<b>G</b>	dR110	Azul
<b>T (U)</b>	dROX™	Vermelho

À semelhança de procedimentos anteriores, foi criada uma alíquota, num tubo *Eppendorf* de 1,5ml, contendo a solução, para o número de amostras a analisar, todos os componentes da reação, sendo colocada de seguida nos respetivos tubos, de 0,2ml, 7µl de reagentes (tabela 8) aos quais foi adicionado 3µl de produto *PCR* purificado. As amostras foram, por fim, inseridas no termociclador, onde foram sujeitas a ciclos térmicos com as características apresentadas na tabela 11.

Tabela 11 - Programa do termociclador utilizado para a reação *SNaPshot*

N.º de ciclos	Tempo	Temperatura
1	5 min	96°C
25	10 s	96 °C
	30 s	60 °C
-	∞	4 °C

Fonte: Adaptado do protocolo de *ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit*

### III.2.8 Purificação dos fragmentos obtidos da reação com *SAP* (*Shrimp Alkaline Phosphatase*)

Estando concluída a reação *SNaPshot*, procedeu-se à realização de uma reação de purificação dos fragmentos obtidos, à semelhança do que se verificou na reação com *ExoSAP-IT®*, sendo desta vez o objetivo da purificação o desfosforilamento dos *ddNTP*'s em excesso na reação, por forma a evitar interferências em reações enzimáticas posteriores.

Neste caso, a purificação foi realizada com *Shrimp Alkaline Phosphatase* – *SAP*, produzida pela *USB Corporation*. Primeiramente procedeu-se à preparação da mistura de reação numa proporção de 2:1, a qual continha, respetivamente, *10x SAP Reaction Buffer* e *Shrimp Alkaline Phosphatase*. Ao produto da reação anterior, reação *SNaPshot*, foi adicionado 2 µl da mistura de reação, *10x SAP Reaction Buffer* e *Shrimp Alkaline Phosphatase*, obtendo um volume final de 12 µl e procedendo-se à incubação no termociclador, como é referido na tabela 12.

Tabela 12 - Programa do termociclador utilizado para a reação de purificação com *SAP*

Fase	Tempo	Temperatura
Incubação	60 min	37 °C
Inativação da <i>SAP</i>	15 min	65 °C
-	∞	4 °C

### **III.2.9 Desnaturação dos fragmentos de ADN e análise dos fragmentos em sequenciador automático**

Para finalizar a análise laboratorial, procedeu-se a uma última reação, antes de colocar as amostras no sequenciador automático ABI Prism® 310 Genetic Analyzer da Applied BioSystems.

Pretendeu-se, com esta reação, desnaturar os fragmentos de ADN, utilizando-se a formamida, *HI-DI™ formamide* (Applied BioSystems) como agente desnaturante conjuntamente com um padrão interno, *GeneScan™-120 LIZ™* (Applied BioSystems), que permitiu identificar a dimensão dos fragmentos em análise através dos respetivos pesos moleculares.

Para a preparação desta mistura, usaram-se tubos de 0,2 ml específicos para o sequenciador utilizado, *ABI Prism® 310 Genetic Analyzer* da Applied BioSystems. Inicialmente, colocou-se nestes tubos 11,8 µl de *HI-DI™ formamide* sendo posteriormente adicionado 1 µl de produto de reação do *SnapShot* purificado e 0,2 µl de *GeneScan™-120 LIZ™*. De seguida a mistura foi colocada no termociclador a 95 °C durante 5 minutos.

Retiradas do termociclador, as amostras, foram, finalmente, colocadas no sequenciador ABI Prism® 310 Genetic Analyzer da Applied BioSystems, realizando-se neste uma eletroforese em capilar e onde através da aplicação de alta voltagem os fragmentos de ADN foram separados por tamanho sendo detetados por um sistema de *laser*.

### **III.2.10 Leitura dos resultados**

O resultado da análise realizada no sequenciador automático, é interpretado com recurso ao *software Genescan* (ABI Prism™ Genescan, V. 3.7.), que transforma a informação fornecida pelo sequenciador automático em eletroferogramas a partir dos quais é possível identificar os diferentes polimorfismos, de acordo com a informação contida na tabela 13, os tamanhos em pares de bases (pb) esperados para os fragmentos que identificam os *SNP's* correspondem aos polimorfismos até agora visualizados, os valores apresentados em branco são devido à não visualização do polimorfismo, até ao momento.

O eletroferograma resulta da combinação entre a identificação do comprimento de onda da fluorescência emitida pelo fragmento que passa pelo laser e da determinação do peso molecular dos fragmentos obtido por comparação com o padrão interno.

Tabela 13 - Informação para interpretação dos eletroferogramas.

Exão	Mutação	Base	Fluorescência	Mutação vs. Normal	Tamanho (pb)
<b>I</b>	<b>F94L (C - A)</b>	<b>G (C)</b>	Azul	Normal	35,5
		<b>T (A)</b>	Vermelho	Mutação	37,5
<b>II</b>	<b>nt 414 (C – T)</b>	<b>C</b>	Preto	Normal	24
		<b>T</b>	Vermelho	Mutação	26
	<b>nt 419 (del 7 – ins 10)</b>	<b>A (T)</b>	Verde	Normal	32
		<b>T (A)</b>	Vermelho	Mutação	
	<b>Q204X (C – T)</b>	<b>C</b>	Preto	Normal	39,5
		<b>T</b>	Vermelho	Mutação	40,7
	<b>E226X (G – T)</b>	<b>C (G)</b>	Preto	Normal	43,5
		<b>A (T)</b>	Verde	Mutação	
<b>III</b>	<b>nt 821 (del 11)</b>	<b>C</b>	Preto	Mutação	49,6
		<b>T</b>	Vermelho	Normal	50,6
	<b>E291X (G – T)</b>	<b>G</b>	Azul	Normal	52,6
		<b>T</b>	Vermelho	Mutação	
	<b>C313Y (G – A)</b>	<b>C (G)</b>	Preto	Normal	56
		<b>T (A)</b>	Vermelho	Mutação	

### III.3. Análise Estatística

De forma a avaliar os resultados laboratoriais obtidos e a influência dos polimorfismos identificados no gene da miostatina em alguns caracteres de crescimento e conformação, procedeu-se a diversas análises estatísticas através do programa SAS (SAS Institute. 2004).

#### III.3.1 Análise das frequências genotípicas e génicas para cada uma das mutações

A primeira abordagem aos resultados passou pela determinação das frequências genotípicas e génicas para cada uma das mutações. As frequências genotípicas e génicas foram calculadas através do PROC FREQ do SAS tendo em consideração as seguintes equações (Equação 4 e 5).

Equação 4 - Expressão utilizada para o cálculo das frequências genotípicas

$$f_{ij} = n_{ij} / N$$

Onde  $f_{ij}$  representa a frequência do genótipo  $ij$ ,  $n_{ij}$  o número de observações registadas para esse genótipo na população considerada e  $N$  o número total de registos na população considerada.

$$f_i = f_{ii} + \sum (1/2 \cdot f_{ij})$$

Onde  $f_i$  representa a frequência do alelo  $i$ ,  $f_{ii}$  a frequência do genótipo homozigoto  $ii$ ,  $f_{ij}$  a frequência dos genótipos heterozigóticos que possuem o alelo  $i$ .

### III.3.2 Análise de independência das frequências genotípicas das mutações

#### F94L e nt821, e a origem do animal

Anteriormente referiu-se que os animais envolvidos neste estudo, para além de origem portuguesa, também, tinham origem francesa e espanhola. Dado este facto, procedeu-se à determinação das frequências genotípicas relativamente à origem dos animais, considerando-se todos os animais não portugueses num só grupo obtendo-se assim dois grupos: Português e Estrangeiro. Esta análise, à semelhança da anterior, foi realizada com o PROC FREQ do programa SAS.

Posteriormente, realizou-se um teste de independência de  $\chi^2$  por forma a verificar a independência entre a origem do animal e o genótipo para as mutações.

### III.3.3 Estudo da associação dos polimorfismos encontrados nas mutações

#### F94L e nt821 com o fenótipo de cada animal

Após as duas análises iniciais, e considerando como variável resposta os caracteres de crescimento PN, P120d e P210d, e os caracteres de conformação DM, DS e AF, estes foram submetidos a uma análise de variância através do PROC GLM, do programa SAS, com o objectivo de avaliar a influência destas duas mutações, F94L e nt821. Os referidos caracteres foram analisados com um modelo que incluía, para além dos efeitos de cada uma das mutações (F94L ou nt821), os efeitos ambientais do ano de nascimento (em que os animais nascidos até 2004 estão incluídos num só grupo, e os animais nascidos em 2012 e 2013 noutro grupo), estação do ano em que nasceram e idade da mãe ao parto como covariável linear e quadrática. O modelo de análise dos caracteres de conformação (DM, DS e AF) incluiu como covariável o efeito linear da idade do animal à pontuação.

Foi realizada outro tipo de análise, considerando-se os animais com registos de pesos e de conformação disponíveis e cujo pai tivesse sido genotipado para as mutações F94L e nt821. Esta análise foi realizada com o PROC MIXED do programa SAS, com um modelo misto que incluía para além do genótipo do pai para as mutações F94L e nt821 os efeitos fixos do criador, do ano, mês de nascimento e do sexo do animal e a idade da mãe ao parto (efeito linear e quadrático). Como efeito aleatório foi considerado o touro (o número médio de filhos

por touro foi de 55 e variou entre 3 e 218). Para os caracteres de conformação foi ainda considerado o efeito linear da idade à pontuação.

Individualmente, cada *locus* foi considerado no modelo de análise como covariável (efeito fixo) cujo valor correspondia à probabilidade que o indivíduo, com registo de crescimento ou conformação, tem de receber do pai (touro genotipado) uma cópia do respetivo alelo mutante, podendo assumir valores de 0,0; 0,5 ou 1,0 (correspondendo, respetivamente, aos casos em que o touro não possuía o alelo em causa, era heterozigótico ou era homozigótico para o alelo). Quando o genótipo do pai influenciou significativamente o carácter analisado procedeu-se à estimativa do coeficiente de regressão, correspondente à variação do carácter analisado por cada cópia do alelo que o indivíduo recebe do pai.



#### IV. Resultados e discussão

Os diferentes genótipos observados para o gene da miostatina são apresentados na tabela 14, que considera somente as mutações onde foram identificados polimorfismos nos 82 animais envolvidos no estudo, bem como os respectivos eletroferogramas padrão.

O primeiro genótipo apresentado, designado de genótipo teste, resultou do teste de metodologia realizado ao *primer* da mutação F94L, em virtude de não ter sido encontrado o genótipo normal para esta mutação nos animais genotipados e dado ser, até à data, o único que nunca tinha sido testado no Laboratório de Genética Molecular da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Biotecnologias e Recursos Genéticos, INIAV- Fonte Boa. Para o referido teste foi utilizado ADN de animais da raça Mertolenga, dado até ao momento não haver registo da presença da mutação F94L nesta raça.

No que se refere aos genótipos observados no locus F94L, com a exceção de um animal heterozigoto (N+), todos eram homozigotos para esta mutação (++). Observou-se ainda que três animais que eram homozigóticos para a mutação F94L (++), também eram heterozigóticos para a mutação nt414 (N+). Também foram identificados oito animais com ambas as mutações nt821 e F94L, verificando-se que eram heterozigóticos nestes loci. Para além das mutações já referidas, observou-se um animal heterozigoto em três das mutações onde ocorreu o polimorfismo (nt414, F94L e Q204X).

Por último, é de referir que dada a fraca qualidade do seu ADN não foi possível genotipar um animal para a mutação F94L, apresentando-se este com o genótipo normal para as restantes mutações.

Não foi detetado na população analisada qualquer animal homozigótico selvagem para a mutação F94L (NN).

Estes resultados encontram-se de acordo com os obtidos por Grobet *et al.* (1998) para a raça Limousine dado que, também, foi verificada maior frequência de animais homozigotos para a mutação F94L, bem como a presença em menor frequência da mutação Q204X e nt414. A mesma situação foi verificada por Dunner *et al.* (2003) quando observou uma frequência de 100% para a mutação F94L nos animais da raça Limousine.

Esta elevada frequência foi também verificada por Pitchfor, investigador da *Adelaide University* na Austrália, que relata a presença do genótipo homozigoto para a mutação em 98,3%, nos animais testados (<http://limousin.co.uk/category/f94l-profit-gene/>).

Contudo a presença da mutação F94L pode ser também encontrada nas raças, Pirenaica, Asturiana dos Vales, Parthenaise, Charolesa, Rubia Gallega embora se verifique a sua presença em menor frequência como foi observado por Miranda *et al.* (2002).

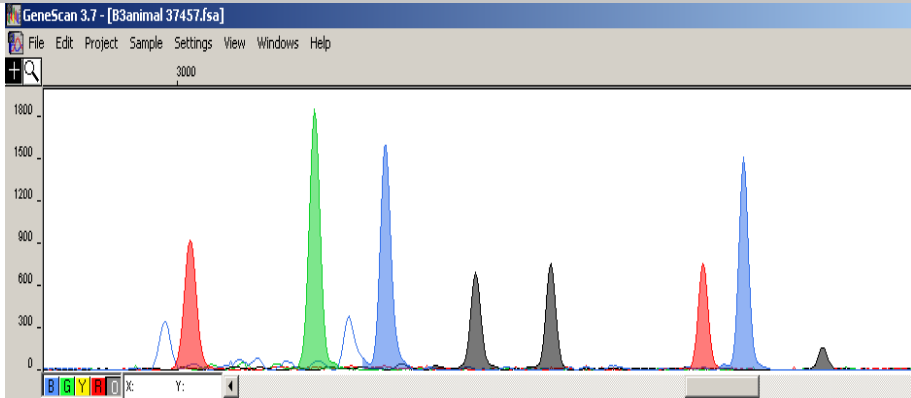
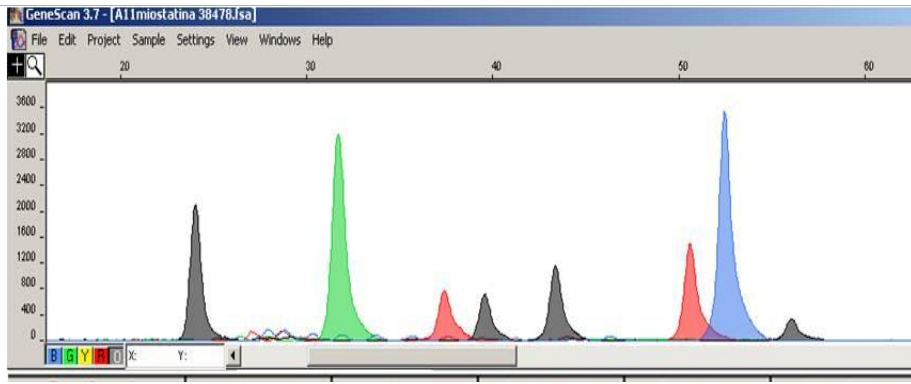
Situação semelhante foi verificada por Dunner *et al.* (2003), para outras raças observando-se uma frequência maioritária de uma mutação para uma determinada raça, caso da raça Asturiana dos Vales, onde foi observada uma frequência de 90% para a mutação nt821

(del11) nos animais estudados e da raça Bazadaise onde se observou uma frequência de 100% para a mutação nt374-51 (T-C).

A presença da mutação nt821 em oito dos nove animais onde também foi observada a heterozigotia na mutação F94L, suscita a possibilidade de existir uma relação entre estas duas mutações. A explicação para esta relação poderá obter-se através da análise dos haplotípos, que não foi possível efectuar durante este estudo.

Neste estudo as mutações F94L e nt821 foram as observadas com maior frequência num maior número de animais, por outro lado no estudo efectuado na raça autóctone Preta, também, só duas mutações foram observadas em maior frequência, a nt414 e a nt821 (Ferreira, 2006).

Tabela 14 - Distribuição dos genótipos observados para o gene da miostatina

	nt414	F94L	Q204X	nt821	N.º de animais	Imagem genótipo
<b>GTeste</b>	N N	N N	N N	N N	Mertolengos	 <p>GeneScan 3.7 - [B3animal 37457.fsa]</p>
<b>G1</b>	N N	+ +	N N	N N	68	 <p>GeneScan 3.7 - [A11miostatina 38478.fsa]</p>

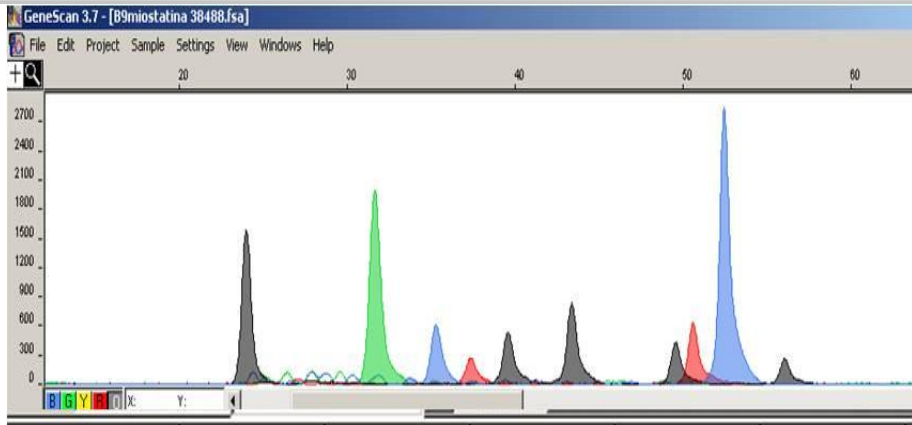
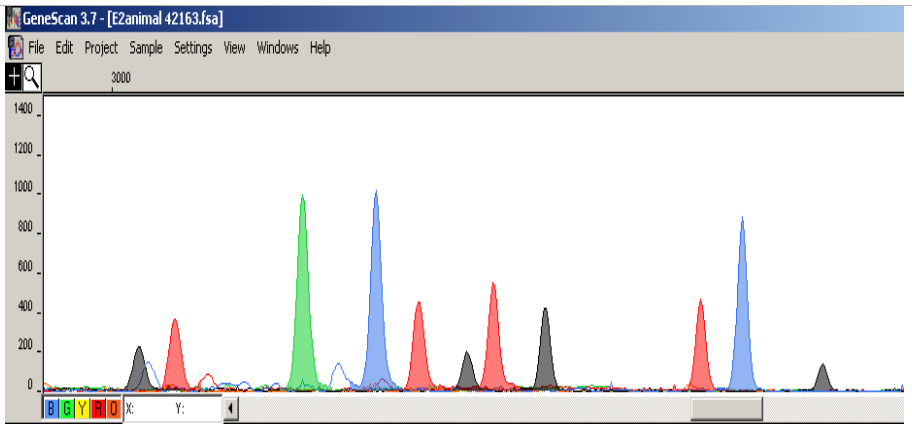
Onde: N - representa o alelo normal; + - representa o alelo para a mutação e G - genótipo

Tabela 14 (continuação) - Distribuição dos genótipos observados para o gene da miostatina

	nt414	F94L	Q204X	nt821	N.º de animais	Imagem genótipo
<b>G2</b>	N N	N +	N N	N N	1	
<b>G3</b>	N +	+ +	N N	N N	3	

Onde: N - representa o alelo normal; + - representa o alelo para a mutação e G - genótipo

Tabela 14 (continuação) - Distribuição dos genótipos observados para o gene da miostatina

	nt414	F94L	Q204X	nt821	N.º de animais	Imagem genótipo
<b>G4</b>	N N	N +	N N	N +	8	 <p>GeneScan 3.7 - [B9miostatina 38488.fsa]</p>
<b>G5</b>	N +	N +	N +	N N	1	 <p>GeneScan 3.7 - [E2animal 42163.fsa]</p>

Onde: N - representa o alelo normal; + - representa o alelo para a mutação e G - genótipo

Tabela 14 (continuação) - Distribuição dos genótipos observados para o gene da miostatina

	nt414		F94L		Q204X		nt821		N.º de animais	Imagem genótipo
<b>G6</b>	N	N	?	?	N	N	N	N	1	Como resultado da baixa qualidade do eletroferograma não foi incluída a respectiva imagem.

Onde: N - representa o alelo normal; + - representa o alelo para a mutação e G - genótipo

#### **IV.1. Resultado da análise das frequências genótípicas e génicas para cada uma das mutações**

A determinação das frequências genótípicas para cada mutação revelou a presença de polimorfismos em apenas quatro das oito mutações analisadas ou seja, verificou-se que o genótipo normal (NN) surge com uma frequência de 100% para as mutações nt419 (tabela 17; figura 11), E226X (tabela 23; Figura 17), E291X (tabela 27; figura 21) e C313Y (tabela 29; figura 23).

Quanto às mutações onde foram encontrados polimorfismos, na mutação nt414 registou-se uma frequência de apenas 5% para o genótipo N+, observando-se 95% dos animais com genótipo normal (NN) (tabela 15; figura 9).

Já a mutação F94L apresentou uma frequência de 88% do genótipo homozigoto para a mutação (++), correspondendo os restantes 12% a animais heterozigotos (tabela 19; figura 13).

Relativamente à mutação Q204X verificou-se apenas 1% de genótipos N+ e 99% de animais com genótipo normal (tabela 21; figura 15).

Por último registou-se na mutação nt821 uma frequência de 10% de animais com genótipo N+, apresentando os restantes 90% o genótipo normal (tabela 25; figura 19).

Para além das frequências genótípicas, efetuou-se, também, o cálculo das frequências génicas para cada mutação (tabelas 16; 18; 20; 22; 24; 26; 28 e 30)

Verificou-se a ausência de animais homozigóticos para um dos possíveis genótipos em todas as mutações. Estes resultados devem-se, possivelmente, ao facto da frequência de alguns alelos ser muito reduzida.

Segundo Gama (2002) a lei de Hardy-Weinberg pressupõe a existência de uma população teoricamente infinita. De facto, ainda que o número de animais incluídos neste estudo seja razoável, afasta-se consideravelmente deste pressuposto. Ainda que possam ocorrer erros de amostragem devido à dimensão da amostra, os resultados obtidos na população Limousine existente atualmente em Portugal, indicam que a frequência de alguns genótipos, nas mutações estudadas, é atualmente reduzida.

Diversos fatores poderão estar relacionados com a seleção a favor de um determinado genótipo. Miranda *et al.* (2002), entre outros autores, refere que a mutação F94L em heterozigotia e em conjunto com outras mutações, como a nt821 poderá resultar numa maior expressão de hipertrofia muscular. Os mesmos autores sugerem que este efeito fenotípico pode ser a causa subjacente para a difusão da mutação F94L em muitas raças, apontando como exemplo as raças bovinas Limousine e Pirenaica.

Tabela 15 - Frequências genotípicas observadas para a mutação nt414

Genótipo	N.º de animais	Frequências genotípicas (valores arredondados)
<b>++</b>	0	0
<b>N+</b>	4	0,05
<b>NN</b>	78	0,95
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>1</b>

Tabela 16 - Frequências gênicas observadas para a mutação nt414

Alelos	Frequências gênicas (valores arredondados)
<b>+</b>	0,02
<b>N</b>	0,98
<b>Total</b>	<b>1</b>

Figura 9 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação nt414

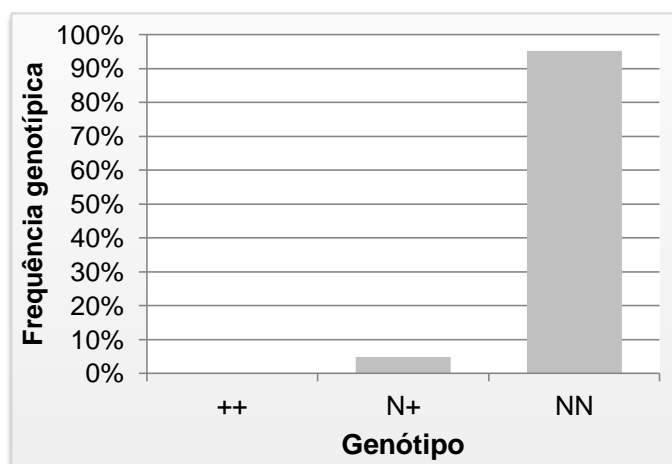


Figura 10 - Distribuição das frequências gênicas observadas para a mutação nt414

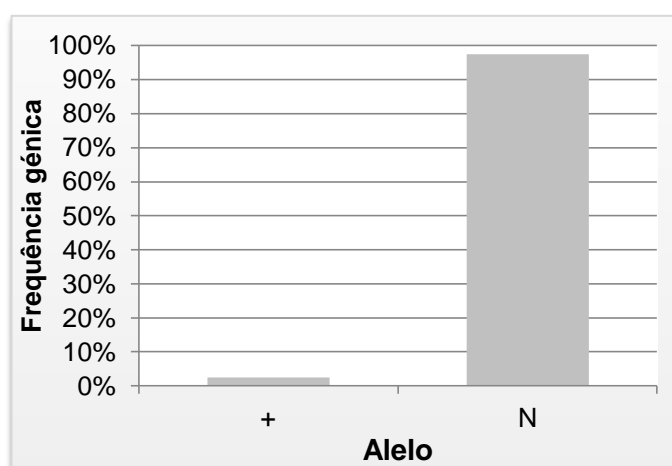




Tabela 17 - Frequências genotípicas observadas para a mutação nt419

Genótipo	N.º de animais	Frequências genotípicas
<b>++</b>	0	0
<b>N+</b>	0	0
<b>NN</b>	82	1
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>1</b>

Tabela 18 - Frequências génicas observadas para a mutação nt419

Alelos	Frequências génicas
<b>+</b>	0
<b>N</b>	1
<b>Total</b>	<b>1</b>

Figura 11 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação nt419

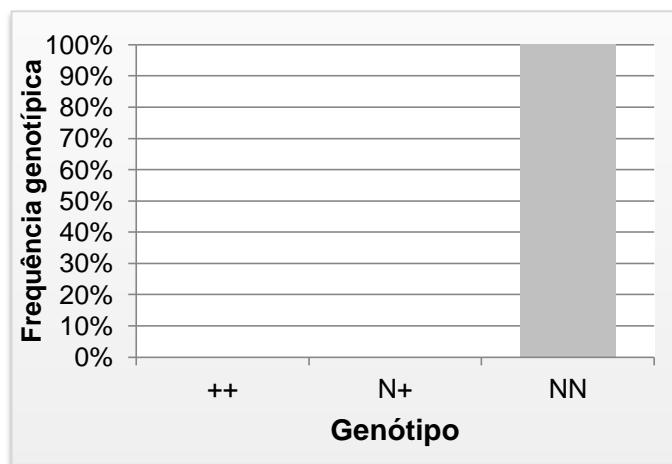


Figura 12 - Distribuição das frequências génicas observadas para a mutação nt419

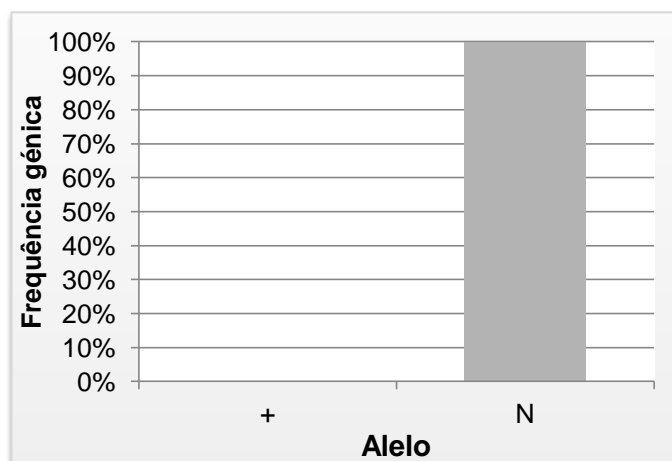


Tabela 19 - Frequências genotípicas observadas para a mutação F94L

Genótipo	N.º de animais	Frequências genotípicas (valores arredondados)
<b>++</b>	71	0,88
<b>N+</b>	10	0,12
<b>NN</b>	0	0
<b>Total</b>	<b>81</b>	<b>1</b>

Tabela 20 - Frequências génicas observadas para a mutação F94L

Alelos	Frequências génicas (valores arredondados)
<b>+</b>	0,94
<b>N</b>	0,06
<b>Total</b>	<b>1</b>

Figura 13 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação F94L

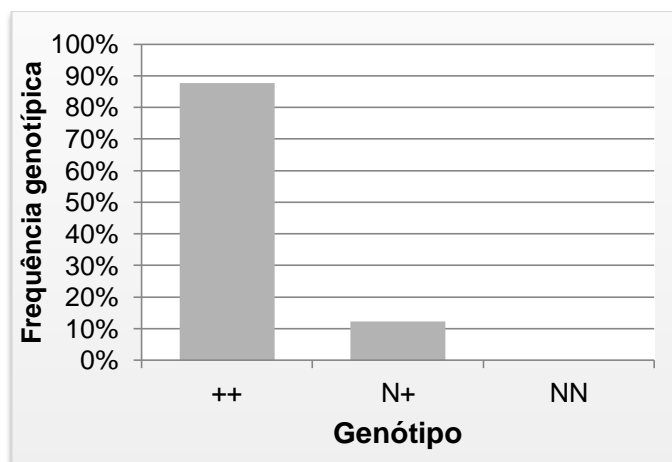


Figura 14 - Distribuição das frequências génicas observadas para a mutação F94L

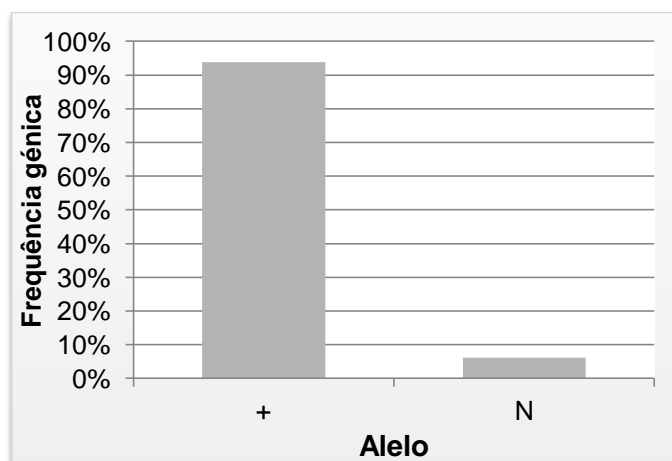


Tabela 21 - Frequências genotípicas observadas para a mutação Q204X

Genótipo	N.º de animais	Frequências genotípicas (valores arredondados)
<b>++</b>	0	0
<b>N+</b>	1	0,012
<b>NN</b>	81	0,988
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>1</b>

Tabela 22 - Frequências génicas observadas para a mutação Q204X

Alelos	Frequências génicas (valores arredondados)
<b>+</b>	0,006
<b>N</b>	0,994
<b>Total</b>	<b>1</b>

Figura 15 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação Q204X

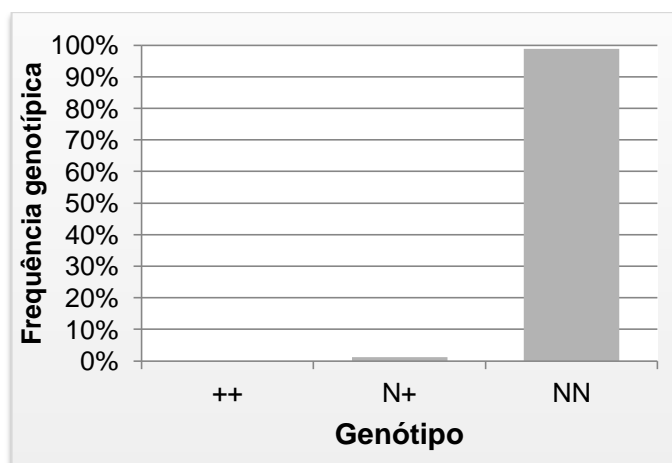


Figura 16 - Distribuição das frequências génicas observadas para a mutação Q204X

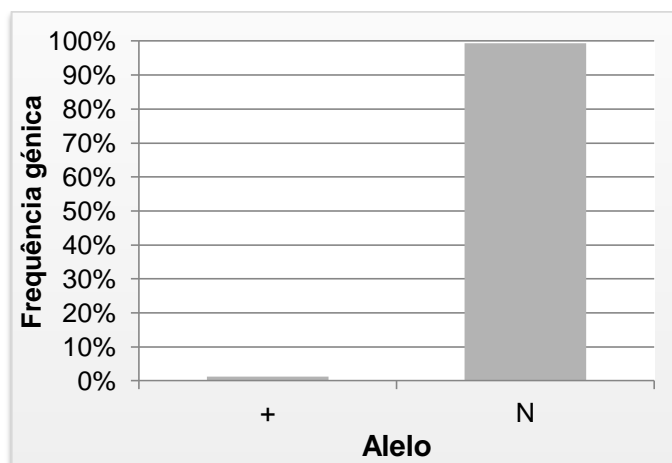


Tabela 23 - Frequências genotípicas observadas para a mutação E226X

Genótipo	N.º de animais	Frequências genotípicas
<b>++</b>	0	0
<b>N+</b>	0	0
<b>NN</b>	82	1
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>1</b>

Tabela 24 - Frequências génicas observadas para a mutação E226X

Alelos	Frequências génicas
<b>+</b>	0
<b>N</b>	1
<b>Total</b>	<b>1</b>

Figura 17 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação E226X

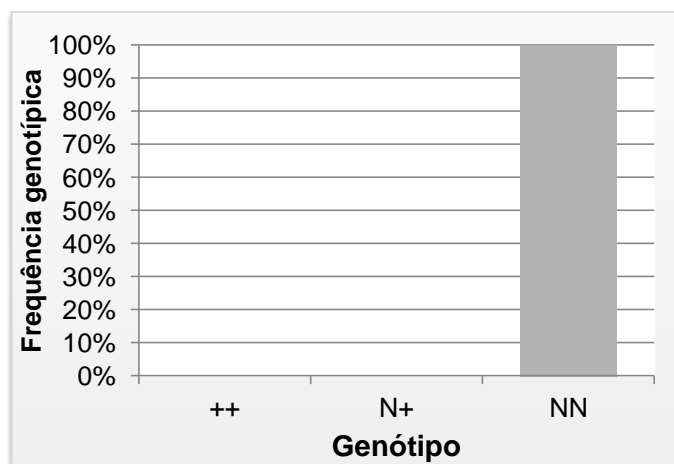


Figura 18 - Distribuição das frequências génicas observadas para a mutação E226X

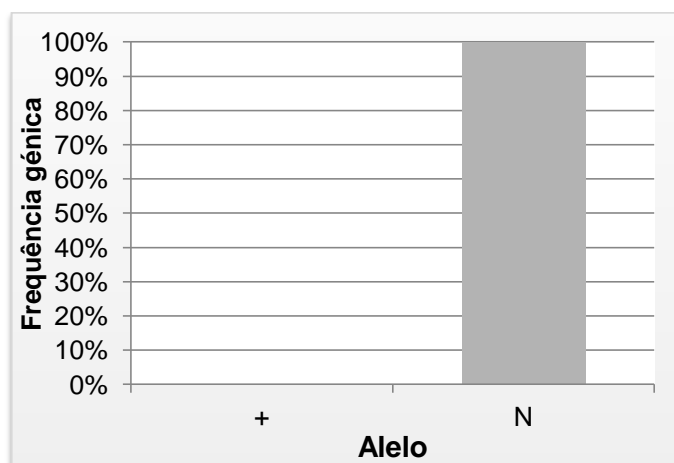


Tabela 25 - Frequências genotípicas observadas para a mutação nt821

Genótipo	N.º de animais	Frequências genotípicas (valores arredondados)
<b>++</b>	0	0
<b>N+</b>	8	0,10
<b>NN</b>	74	0,90
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>1</b>

Tabela 26 - Frequências gênicas para a mutação nt821

Alelos	Frequências gênicas (valores arredondados)
<b>+</b>	0,05
<b>N</b>	0,95
<b>Total</b>	<b>1</b>

Figura 19 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação nt821

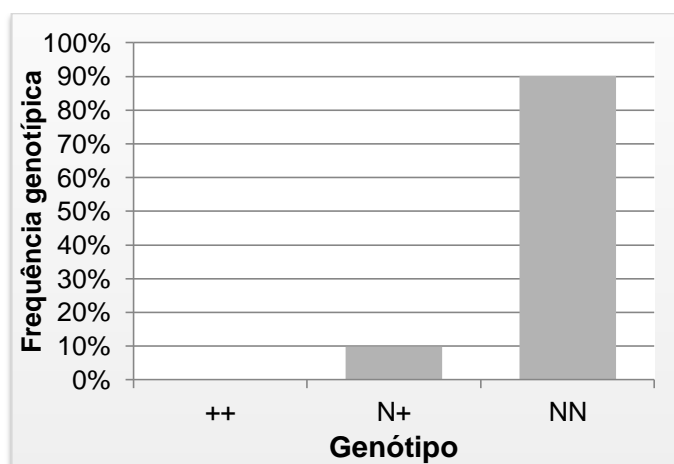


Figura 20 - Distribuição das frequências gênicas observadas para a mutação nt821

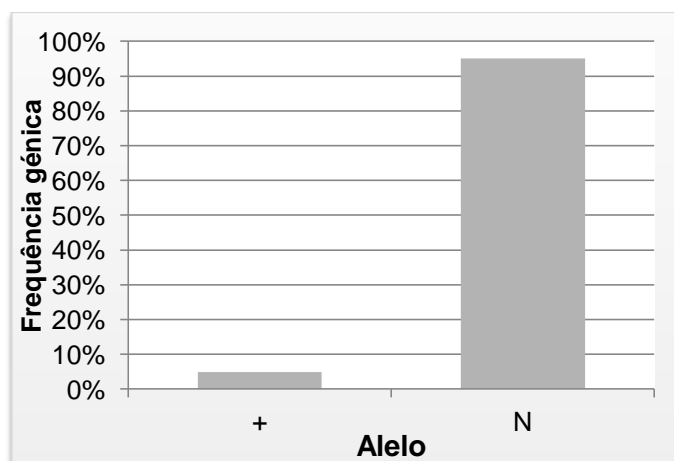


Tabela 27 - Frequências genotípicas observadas para a mutação E291X

Genótipo	N.º de animais	Frequências genotípicas
<b>++</b>	0	0
<b>N+</b>	0	0
<b>NN</b>	82	1
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>1</b>

Tabela 28 - Frequências génicas observadas para a mutação E291X

Alelos	Frequências génicas
<b>+</b>	0
<b>N</b>	1
<b>Total</b>	<b>1</b>

Figura 21 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação E291X

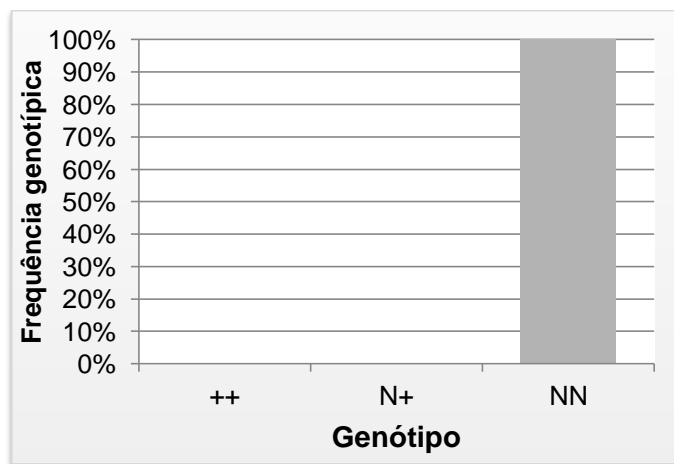


Figura 22 - Distribuição das frequências génicas observadas para a mutação E291X

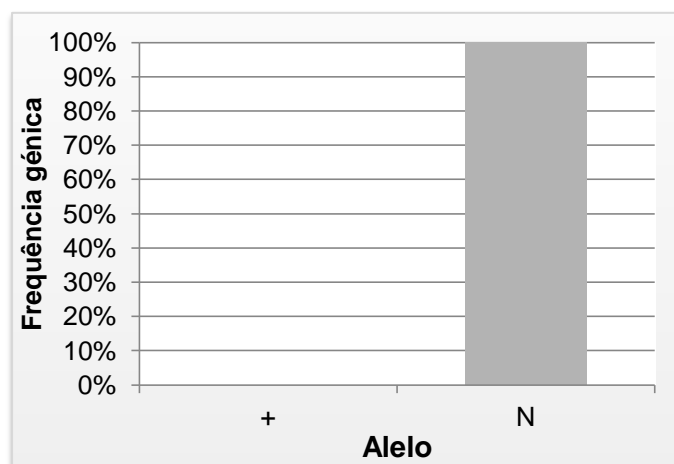


Tabela 29 - Frequências genotípicas observadas para a mutação C313Y

Genótipo	N.º de animais	Frequências genotípicas
<b>++</b>	0	0
<b>N+</b>	0	0
<b>NN</b>	82	1
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>1</b>

Tabela 30 - Frequências génicas observadas para a mutação C313Y

Alelos	Frequências génicas
<b>+</b>	0
<b>N</b>	1
<b>Total</b>	<b>1</b>

Figura 23 - Distribuição das frequências genotípicas observadas para a mutação C313Y

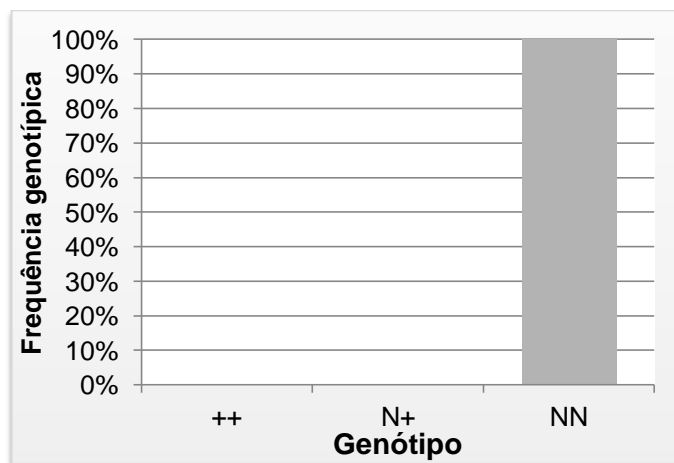
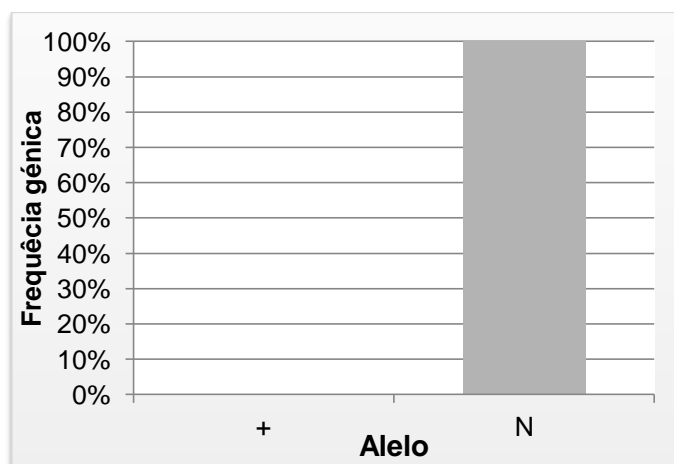


Figura 24 - Distribuição das frequências génicas observadas para a mutação C313Y



#### **IV.2. Resultado da associação das frequências genotípicas para as mutações F94L e nt821 e a origem do animal**

Em virtude dos animais envolvidos no estudo provirem de três países diferentes, optou-se por realizar um teste  $\chi^2$  de independência por forma a verificar a independência entre os fatores, país de origem e genótipo do animal.

No entanto, para a realização deste teste não foram consideradas todas as mutações mas apenas naquelas em que se observou polimorfismos em maior número de animais designadamente a F94L (71+10=81 animais) e a nt821 (8 animais). Para além disso e dado que existiam animais oriundos de França e de Espanha, considerou-se apenas duas variáveis resposta Estrangeiro e Português englobando a primeira todos os animais de origem não portuguesa.

Antes do teste  $\chi^2$  de independência, foram previamente determinadas as frequências genotípicas para as duas mutações, relativamente à origem do animal (tabela 31 e 32 e figura 25 e 26).

Para a realização deste teste foi determinado o número de graus de liberdade (g.l.), que resultou da seguinte expressão  $(a-1) \times (b-1)$ , onde a e b correspondem, respetivamente, ao número de níveis do fator genótipo e ao número de níveis do fator país de origem, obtendo-se  $g.l. = (2-1) \times (2-1) = 1$ . Foi considerado um nível de significância  $\alpha=0,05$ , obtendo-se para 1 g.l. um  $\chi^2_{critico} = 3,841$  ( $\chi^2_1$  para  $\alpha = 0,05$ ).

A hipótese nula ( $H_0$ ) foi definida como: as variáveis que compõem a tabela de contingência (genótipos e país de origem) são independentes; e será rejeitada se  $\chi^2_{observado} > 3,841$ .

Para a mutação F94L obtiveram-se valores de  $\chi^2_{observado}=0,3621$  e para a mutação nt821  $\chi^2_{observado}=0,5455$ , desta forma pode-se concluir que, para um nível de significância de  $\alpha=0,05$  não se rejeita a independência entre os dois fatores (genótipos e país de origem) tanto para a mutação F94L como para a nt821. Os resultados obtidos indicam que, para as mutações F94L e nt821, as frequências genotípicas observadas são independentes do país de origem. O gene F94L parece generalizado na raça bovina Limousine e a frequência elevada de homozigóticos mutantes é possivelmente comum a vários países, pelo que não seria de esperar, diferenças entre Portugal, Espanha ou França.



Tabela 31 - Número de animais por genótipo para a mutação F94L relativamente à origem dos animais

Genótipo	Origem do Animal		Total
	Estrangeiro	Português	
<b>++</b>	16	55	71
<b>N+</b>	1	9	10
<b>Total</b>	17	64	<b>81</b>

Figura 25 - Distribuição quanto à origem dos animais das frequências genotípicas para a mutação F94L

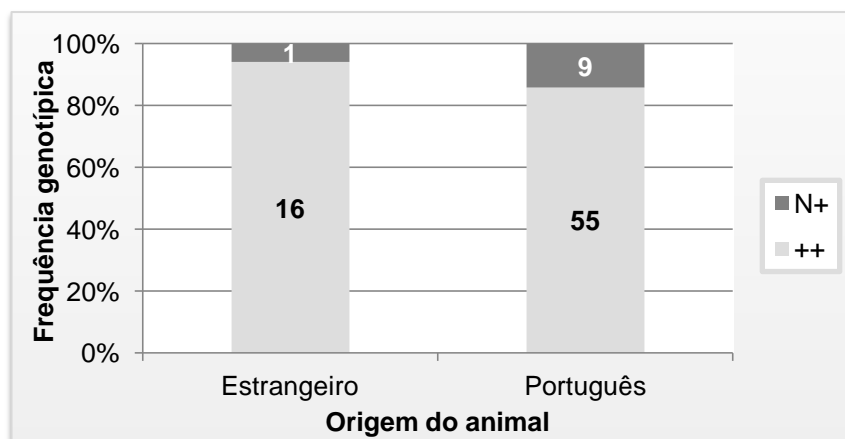
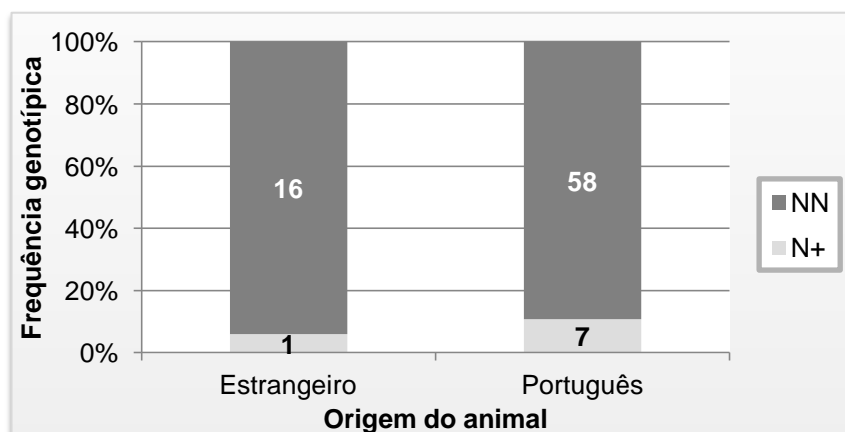


Tabela 32 - Número de animais por genótipo para a mutação nt821 relativamente à origem dos animais

Genótipo	Origem do Animal		Total
	Estrangeiro	Português	
<b>N+</b>	1	7	8
<b>NN</b>	16	58	74
<b>Total</b>	17	65	<b>82</b>

Figura 26 - Distribuição quanto à origem dos animais das frequências genotípicas para a mutação nt821



### IV.3. Resultados do estudo da associação dos polimorfismos encontrados nas mutações F94L e nt821 com o fenótipo de cada animal

O estudo da influência dos polimorfismos detetados em algumas características de crescimento e conformação foi realizado através de uma análise de variância. Considerou-se como variáveis de resposta o peso ao nascimento (PN) e pesos ajustados aos 120 dias (P120) e 210 dias de idade (P210), o desenvolvimento muscular (DM), desenvolvimento esquelético (DS) e aptidão funcional (AF), cujas estatísticas descritivas apresentam-se na tabela 33.

Tabela 33 - Valores da estatística descritiva para cada variável resposta analisada na análise de variância

		Caracteres de crescimento			Caracteres de Conformação		
		PN	P120	P210	DM	DS	AF
<b>Média</b>		45,65	196,92	333,69	71,93	71,20	69,75
<b>Desvio Padrão</b>		8,00	25,55	37,01	5,73	5,44	6,54
<b>CV(%)</b>		17,52	12,97	11,09	7,97	7,64	9,38
<b>Máximo</b>		67,00	271,35	452,21	83,00	82,00	83,00
<b>Mínimo</b>		23,00	133,69	268,04	57,00	60,00	53,00
<b>N</b>		65	66	68	60	60	60
<b>Mutação</b>		Frequência de animais por genótipos					
<b>F94L</b>	<b>++</b>	<b>56</b>	<b>59</b>	<b>61</b>	<b>54</b>	<b>54</b>	<b>54</b>
	<b>N+</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>nt821</b>	<b>N+</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
	<b>NN</b>	<b>59</b>	<b>62</b>	<b>64</b>	<b>56</b>	<b>56</b>	<b>56</b>

Onde: CV - coeficiente de variação e N - o número de observações

À semelhança do teste  $\chi^2$  de independência, nesta análise de variância apenas se incluiu os efeitos das mutações F94L e nt821 por se terem observado polimorfismos em maior número de animais, tal como já referido no ponto IV.2.

A análise de variância foi realizada individualmente para cada uma das seis variáveis de resposta referidas, mas com um modelo linear semelhante, que incluiu o efeito de cada uma das mutações (F94L ou nt821) e os efeitos ambientais do ano e estação de nascimento, e da idade da mãe ao parto (covariável linear e quadrática). O modelo de análise dos caracteres de conformação (DM, DS e AF) incluiu como covariável o efeito linear da idade do animal à pontuação ao invés da idade da mãe ao parto.

Os resultados da análise de variância dos caracteres de crescimento e de conformação que incluiu o efeito da mutação F94L estão apresentados, respetivamente, nas tabelas 34 e 35.

O modelo de análise utilizado explicou, razoavelmente, a variabilidade entre pesos às várias idades (nascimento, 120 e 210 dias), com coeficientes de determinação entre 0,31 e 0,50. No entanto, apenas a idade da mãe ao parto apresentou um efeito significativo nos pesos às várias idades.

Existem na bibliografia diversas referências que indicam claramente que vitelos filhos de fêmeas mais novas nascem mais leves e crescem menos que os vitelos filhos de vacas adultas (Pell e Thayne, 1978; Cundiff *et al.*, 1966a; Anderson e Willham, 1978; Williams *et al.*, 1979; Bellido, 1985), sendo a idade da mãe ao parto uma fonte de variação do peso dos animais até ao desmame.

Não se verificaram efeitos significativos da mutação F94L no peso ao nascimento bem como nos pesos aos 120 e aos 210 dias de idade entre animais homozigóticos para a mutação e animais heterozigóticos.

Estes resultados poderão estar afetados pela estrutura não balanceada dos dados, uma vez que existem poucos animais heterozigóticos (10), comparativamente ao número de animais homozigóticos para a mutação (71). O facto de também não haver informação sobre animais homozigóticos selvagens (NN), não permitiu avaliar as diferenças entre pesos destes indivíduos e os portadores da mutação. Assim, perante os dados disponíveis, não se pode confirmar um efeito negativo da mutação F94L no peso dos animais ao nascimento, nem um efeito positivo (pesos mais elevados) nos pesos aos 120 e 210 dias de idade.

Contudo, dado que as referências bibliográficas existentes sobre as mutações no gene da miostatina, indicam que apesar de haver vantagens resultantes destas mutações, podem surgir também alguns efeitos negativos associados. Várias mutações, como a nt821, a Q204X e a C313Y, têm revelado estar envolvidas na inativação do gene da miostatina (Kambadur *et al.*, 1997 e Grobet *et al.*, 1998), demonstrando afetar a fertilidade e a facilidade ao parto. No entanto, estes efeitos não surgem quando ocorre somente a presença da mutação F94L, em virtude do seu comportamento conservativo, como foi referido por Miranda *et al.* (2002), entre outros autores.

Os resultados da análise de variância dos caracteres de conformação (tabela 35) demonstram que a mutação F94L também não influenciou significativamente estes caracteres. Apenas o efeito do ano de nascimento influenciou significativamente o DM e DS, respetivamente, para  $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ .

O efeito do ano de nascimento dos animais normalmente reflete o manejo praticado em cada ano, bem como as disponibilidades alimentares, que normalmente são diferentes de ano para ano.

Os resultados na análise de variância dos caracteres de crescimento e conformação que incluíram o efeito da mutação nt821 (tabela 36 e 37) foram muito semelhantes aos da análise que incluiu o efeito da mutação F94L. Os caracteres de crescimento apenas foram influenciados pelo efeito linear e quadrático da idade da mãe ao parto e os caracteres de conformação apenas foram influenciados pelo efeito ambiental do ano de nascimento

Ainda que a mutação nt821 seja mais frequente noutras raças, nomeadamente na Branca Azul Belga e na Asturiana dos Vales (Miranda *et al.*, 2002), observaram-se alguns indivíduos da raça limousine heterozigóticos para esta mutação.

A mutação nt821, ainda que típica da raça Branco Azul Belga, tem sido identificada noutras raças, incluindo a raça bovina autóctone Preta (Ferreira *et al.*, 2006) com efeito já determinado na dimensão e rendimento das peças da carcaça (Ferreira *et al.*, 2012).

Como existem atualmente em Portugal alguns criadores que possuem machos reprodutores com esta mutação verificando-se desta forma, possivelmente já muitos descendentes com esta mutação nt821, seria interessante avaliar o seu efeito nos caracteres de crescimento e de conformação.

O reduzido número de animais genotipados com informação disponível sobre o controle de performances, conjuntamente com uma estrutura não balanceada dos dados, não permitiu concluir um efeito significativo das mutações F94L e nt821 na conformação e crescimento dos animais. No entanto o efeito nos caracteres de crescimento e conformação, resultantes de alterações no gene da miostatina têm sido divulgados por diversos autores, caso do estudo realizado por Esmailizadeh *et al.*, 2008, que observou influência significativa da mutação F94L no desenvolvimento muscular e ósseo em animais resultantes do retrocruzamento entre Limousine e Jersey, bem como o aumento do peso ao nascimento verificado por Casas *et al.* 2004 na raça Charolesa e no cruzamento entre animais Branco Azul Belga e raças autóctones inglesas.

Tabela 34 - Resultados da análise de variância aos caracteres de crescimento para a mutação F94L

		PN	P120	P210
Efeito	g.l.	Valor de F		
Ano Nascimento	8	1,48 <sup>ns</sup>	1,43 <sup>ns</sup>	1,09 <sup>ns</sup>
Estação	3	1,89 <sup>ns</sup>	1,65 <sup>ns</sup>	1,98 <sup>ns</sup>
F94L	1	1,96 <sup>ns</sup>	0,41 <sup>ns</sup>	0,23 <sup>ns</sup>
Idade mãe	1	12,56 <sup>**</sup>	7,98 <sup>**</sup>	5,86 <sup>*</sup>
Idade mãe <sup>2</sup>	1	9,97 <sup>**</sup>	6,55 <sup>*</sup>	5,16 <sup>*</sup>
N		65	66	68
R <sup>2</sup>		0,50	0,32	0,31
Média		45,58	196,70	335,18

Tabela 35 - Resultados da análise de variância aos caracteres de conformação para a mutação F94L

		DM	DS	AF
Efeito	g.l.	Valor de F		
Ano de Nascimento	8	2,29 <sup>*</sup>	3,13 <sup>**</sup>	1,37 <sup>ns</sup>
Estação	3	1,81 <sup>ns</sup>	0,21 <sup>ns</sup>	0,25 <sup>ns</sup>
F94L	1	0,19 <sup>ns</sup>	1,38 <sup>ns</sup>	0,58 <sup>ns</sup>
Idade da pontuação	1	3,29 <sup>ns</sup>	0,26 <sup>ns</sup>	0,34 <sup>ns</sup>
N		60	60	60
R <sup>2</sup>		0,37	0,41	0,27
Média		71,98	71,19	69,72

Onde: g.l. - graus de liberdade do efeito; F - quociente das médias dos quadrados; R<sup>2</sup> - coeficiente de determinação; N - número de animais observados; \* - Significativo para P<0,05; \*\* - Significativo para P<0,01; ns - Não significativo (P>0,05)

Tabela 36 - Resultados da análise de variância aos caracteres de crescimento para a mutação nt821

		PN	P120	P210
Efeito	g.l.	Valor de F		
Ano Nascimento	8	1,49 <sup>ns</sup>	1,40 <sup>ns</sup>	1,18 <sup>ns</sup>
Estação	3	1,95 <sup>ns</sup>	1,68 <sup>ns</sup>	1,98 <sup>ns</sup>
nt821	1	0,27 <sup>ns</sup>	0,22 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>
Idade mãe	1	9,66 <sup>**</sup>	7,24 <sup>**</sup>	6,76 <sup>*</sup>
Idade mãe <sup>2</sup>	1	6,88 <sup>*</sup>	5,83 <sup>*</sup>	6,29 <sup>*</sup>
N		65	66	68
R <sup>2</sup>		0,48	0,32	0,31
Média		45,58	196,70	335,18

Tabela 37 - Resultados da análise de variância aos caracteres de conformação para a mutação nt821

		DM	DS	AF
Efeito	g.l.	Valor de F		
Ano Nascimento	8	2,27 <sup>*</sup>	3,19 <sup>**</sup>	1,33 <sup>ns</sup>
Estação	3	1,71 <sup>ns</sup>	0,2 <sup>ns</sup>	0,28 <sup>ns</sup>
nt821	1	0,05 <sup>ns</sup>	1,16 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>
Idade da pontuação	1	3,16 <sup>ns</sup>	0,40 <sup>ns</sup>	0,41 <sup>ns</sup>
N		60	60	60
R <sup>2</sup>		0,37	0,41	0,26
Média		71,99	71,19	69,72

Onde: g.l. - graus de liberdade do efeito; F - quociente das médias dos quadrados; R<sup>2</sup> - coeficiente de determinação; N - número de animais observados; \* - Significativo para P<0,05; \*\* - Significativo para P<0,01; ns - Não significativo (P>0,05)

Como referido anteriormente, o número de animais genotipados com informação de controlo de performance variou entre os 65 e os 68 animais para os caracteres de crescimento e 60 animais para os caracteres de conformação. Como o reduzido número de dados disponíveis, não permitiu que os factores incluídos nos modelos de análise explicassem, razoavelmente, a variabilidade observada nos caracteres de crescimento e conformação em estudo e, desta forma, influenciassem os resultados, procedeu-se a um outro tipo de análise.

Nesta análise efetuada com um modelo misto, foram incluídos animais com registo de crescimento e conformação e descendentes de animais genotipados, obtendo-se assim um número de observações superior a 1380 (tabela 38).

Tabela 38 - Valores da estatística descritiva para cada variável resposta analisada com o modelo misto

		Caracteres de Crescimento			Caracteres de Conformação		
		PN	P120	P210	DM	DS	AF
<b>Média</b>		42.75	158.74	257.57	60.79	61.73	63.97
<b>Desvio Padrão</b>		6.70	26.22	42.68	7.80	6.39	5.30
<b>Máximo</b>		64.00	241.00	387.00	85.00	85.00	80.00
<b>Mínimo</b>		0	74.00	89.00	30.00	35.00	40.00
<b>N</b>		1381	1381	1381	2130	2130	2130

Mutação		Frequência de animais por genótipos	
<b>F94L</b>	<b>++</b>	1142	1659
	<b>N+</b>	239	471
<b>nt821</b>	<b>N+</b>	218	453
	<b>NN</b>	1163	1677

Onde: N - número de observações

Com esta análise pretendeu-se verificar a influência do genótipo do pai, nos caracteres de crescimento e de conformação dos descendentes, através da probabilidade que o indivíduo tem de receber do pai (touro genotipado) uma cópia do respetivo alelo mutante.

Os resultados da análise em que se incluiu o efeito da mutação F94L demonstraram que todos os fatores considerados no modelo misto, com exceção da respectiva mutação, influenciaram significativamente os três caracteres de crescimento analisados (tabela 38).

Os caracteres de conformação também foram influenciados por todos os efeitos ambientais incluídos no modelo, com exceção da AF que não foi significativamente influenciada pelo sexo do animal do DM e AF, que não foram influenciados pela idade à pontuação e do DS

que não foi influenciado pelo efeito quadrático da idade da mãe. Também, nos caracteres de conformação não houve efeito da mutação F94L (tabela 39).

Contudo, estes resultados não estão de acordo com os obtidos por Esmailzadeh *et al.*, 2008, que verificou que animais homozigotos para a mutação apresentavam maior muscularidade do que os animais heterozigotos.

Os resultados da análise, em que se incluiu o efeito da mutação nt821, demonstram que todos os efeitos ambientais considerados no modelo misto, com exceção da respectiva mutação, influenciaram significativamente os três caracteres de crescimento analisados (tabela 40). Quanto aos caracteres de conformação, foi possível constatar uma influência significativa ( $P < 0,05$ ) da mutação nt821 na AF (0,027) e próxima da significância no DM (0,057). Todos os efeitos ambientais incluídos no modelo de análise também tiveram um efeito significativo nos caracteres de conformação, com exceção da AF que não foi significativamente influenciada pelo sexo do animal, do DS e AF, que não foram influenciados pela idade à pontuação e do DM que não foi influenciado pelo efeito quadrático da idade da mãe.

As estimativas dos coeficientes de regressão linear do desenvolvimento muscular (DM) e da aptidão funcional (AF) por cada cópia do alelo nt821 que o animal recebe do pai, respetivamente,  $5,03 \pm 2,65$  e  $4,11 \pm 1,86$  pontos, demonstraram que esta mutação pode ter um efeito positivo na pontuação obtida nestes caracteres de conformação. Isto é, por cada cópia da mutação nt821 que os animais recebem dos progenitores, em média, terão mais 5,03 pontos na avaliação do DM e mais 4,11 na avaliação da AF (tabela 41).

Tabela 39 - Resultados da Análise de Variância aos caracteres de crescimento e conformação da descendência dos animais genotipados para a mutação F94L

	Caracteres de Crescimento				Caracteres de Conformação			
		PN	P120	P210		DM	DS	AF
Efeito	g.l.	Valor de F			g.l.	Valor de F		
Criador*Ano	63	6,25**	6,27**	8,21**	69	10,43**	11,58**	8,86**
Sexo	1	94,76**	87,34**	198,76**	1	25,91**	162,01**	0,06 <sup>ns</sup>
Mês	11	3,06**	11,40**	9,37**	11	4,64**	6,30**	8,73**
F94L	1	0,95 <sup>ns</sup>	1,69 <sup>ns</sup>	1,22 <sup>ns</sup>	1	0,65 <sup>ns</sup>	1,83 <sup>ns</sup>	0,23 <sup>ns</sup>
Idade mãe	1	18,28**	103,37**	53,96**	1	57,77**	3,65*	6,52**
Idade mãe <sup>2</sup>	1	16,99**	100,20**	55,74**	1	48,27**	2,21 <sup>ns</sup>	7,65**
Idade Pontuação					1	2,84 <sup>ns</sup>	93,13**	0,01 <sup>ns</sup>

Onde: g.l. - graus de liberdade do efeito; F - quociente das médias dos quadrados; \* - Significativo para  $P < 0,05$ ; \*\* - Significativo para  $P < 0,01$ ; ns - Não significativo ( $P > 0,05$ )

Tabela 40 - Resultados da Análise de Variância aos caracteres de crescimento e conformação da descendência dos animais genotipados para a mutação nt821

	Caracteres de Crescimento				Caracteres de Conformação			
		PN	P120	P210		DM	DS	AF
Efeito	g.l.	Valor de F			g.l.	Valor de F		
Criador*Ano	63	6,24**	5,64**	7,80**	69	12,21**	10,21**	10,68**
Sexo	1	94,96**	87,01**	198,25**	1	162,61**	25,84**	0,08 <sup>ns</sup>
Mês	11	3,08**	11,29**	9,36**	11	6,48**	4,64**	8,74**
nt821	1	0,13 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,32 <sup>ns</sup>	1	3,61* <sup>†</sup>	0,49 <sup>ns</sup>	4,88*
Idade mãe	1	18,57**	101,87**	53,03**	1	3,99*	57,43**	6,21*
Idade mãe <sup>2</sup>	1	17,21**	99,21**	54,74**	1	2,48 <sup>ns</sup>	47,79**	7,48**
Idade Pontuação					1	93,47**	2,82 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>

Onde: g.l. - graus de liberdade do efeito; F - quociente das médias dos quadrados; \* - Significativo para P<0,05; \*\* - Significativo para P<0,01; ns - Não significativo (P>0,05); † - 0,057

Tabela 41 - Coeficientes de regressão linear do desenvolvimento muscular (DM) e aptidão funcional (AF) por cada cópia do alelo nt821 que o animal recebe do pai

Caracteres	Coef. Reg. Linear $\pm$ EP (pontos.cópia <sup>-1</sup> )
<b>DM</b>	5,03 $\pm$ 2,65
<b>AF</b>	4,11 $\pm$ 1,86

Em resultado da observação das médias dos pesos relativamente ao sexo do animal para a mutação F94L registaram-se valores mais elevados nos machos, com diferenças médias para as fêmeas de +2,30 kg para o PN, de +10,33 kg para o P120 e de +23,95 para o P210 (figura 27, 28 e 29). Relativamente às médias estimadas para os caracteres de conformação segundo o efeito do sexo do animal, observou-se maior pontuação nos machos para o DM e DS, enquanto para a AF não se observaram diferenças significativas (figura 30, 31 e 32). Confirma-se na análise que incluiu efeito da mutação nt821 o efeito significativo do sexo do animal com uma superioridade média dos machos de +2,34kg no PN, de +9,31 no P120 e de +23,91kg no P210 (figura 33, 34 e 35).



Nos caracteres de conformação as médias estimadas para a pontuação e considerando o efeito do genótipo do pai para a mutação nt821, foram registados valores superiores nos animais influenciados pelo genótipo heterozigoto no DM e na AF, registando-se diferenças de pontuação de 2,52 e de 2,06, respetivamente, contudo para o DS foi registado o inverso, podendo explicar-se o efeito não significativo da mutação nt821 pela pequena diferença registada entre genótipos, 1,008 pontos (figura 37, 39 e 41). Quanto às médias da pontuação sob influência do sexo do animal verificou-se sempre pontuações mais elevadas para os machos, mesmo na AF onde não foi considerada significância do efeito, dado a diferença entre machos e fêmeas ser muito reduzida, 0,058 pontos (figura 36, 38 e 40).

Figura 27 - Média do peso ao nascimento relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação F94L

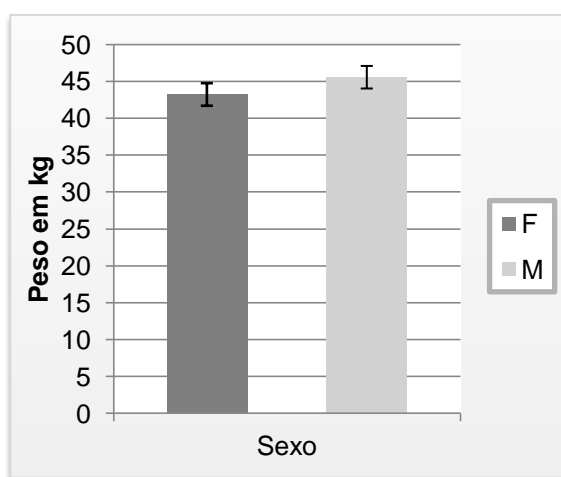


Figura 288 - Média do peso aos 120 dias relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação F94L

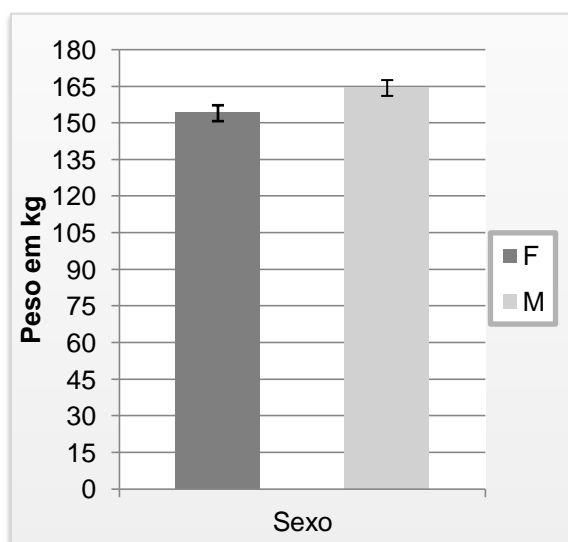


Figura 29 - Média do peso aos 210 dias relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação F94L

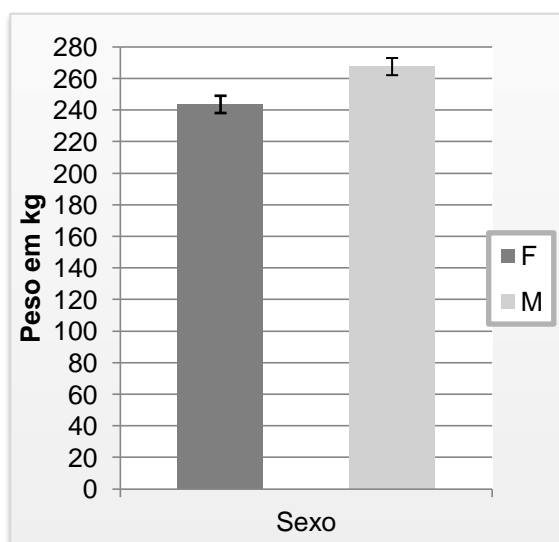


Figura 30 - Média do desenvolvimento muscular relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação F94L

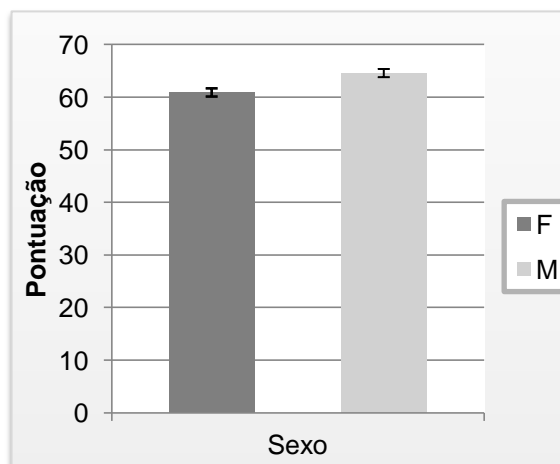


Figura 31 - Média do desenvolvimento esquelético relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação F94L

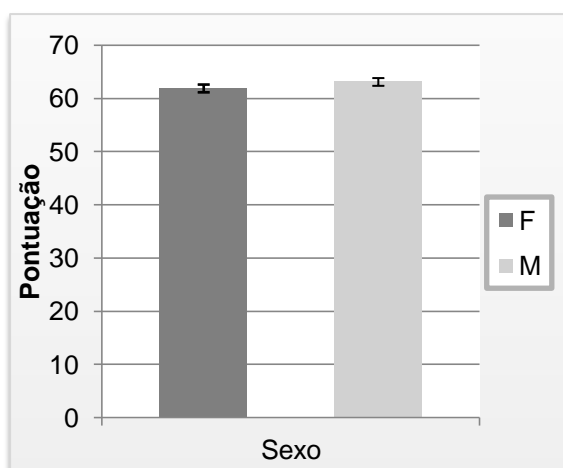


Figura 32 - Média da aptidão funcional relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação F94L

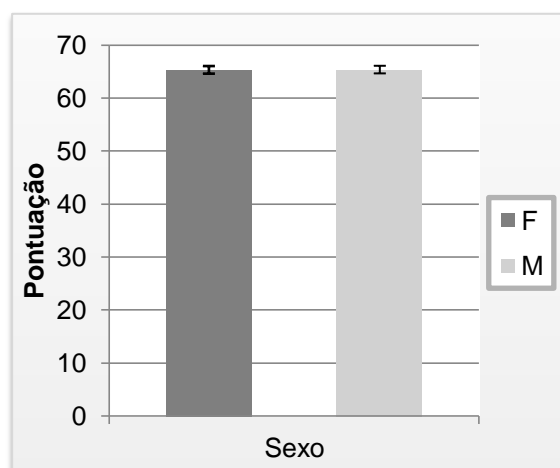


Figura 33 - Média do peso ao nascimento relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação nt821

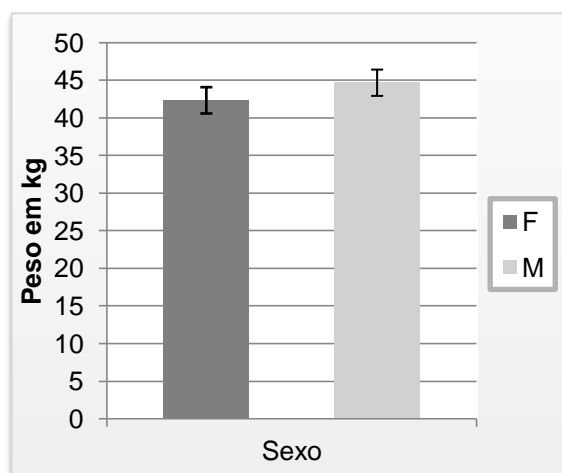


Figura 34 - Média do peso aos 120 dias relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação nt821

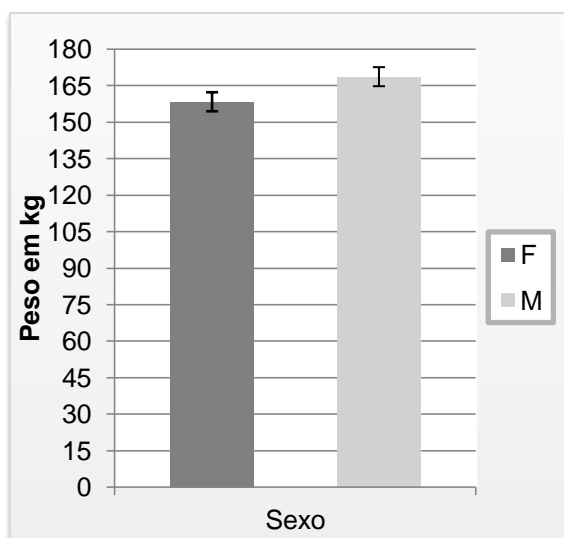


Figura 35 - Média do peso aos 210 dias relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação nt821

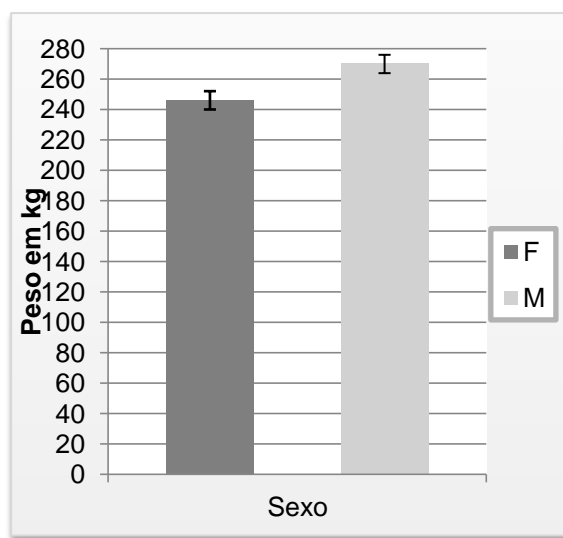


Figura 36 - Média do desenvolvimento muscular relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação nt821

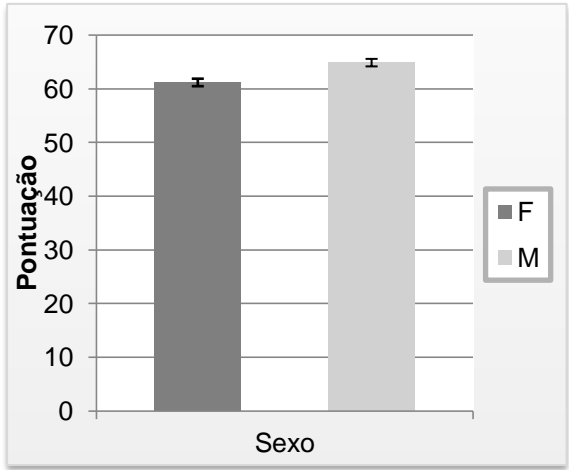


Figura 37 - Média do desenvolvimento muscular para os genótipos da mutação nt821

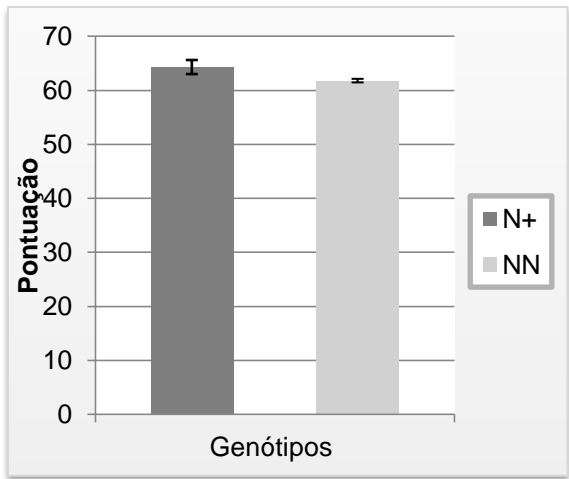


Figura 38 - Média do desenvolvimento esquelético relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação nt821

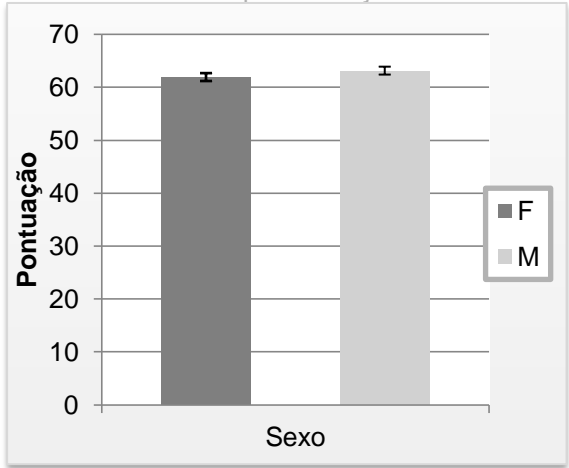


Figura 39 - Média do desenvolvimento esquelético para os genótipos da mutação nt821

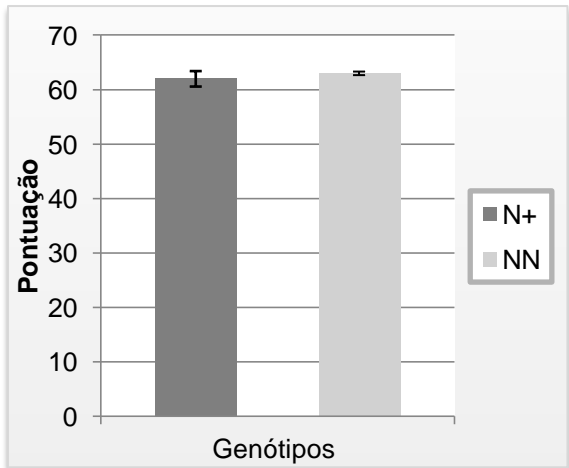


Figura 40 - Média da aptidão funcional relativo ao sexo do animal quando influenciado pela mutação nt821

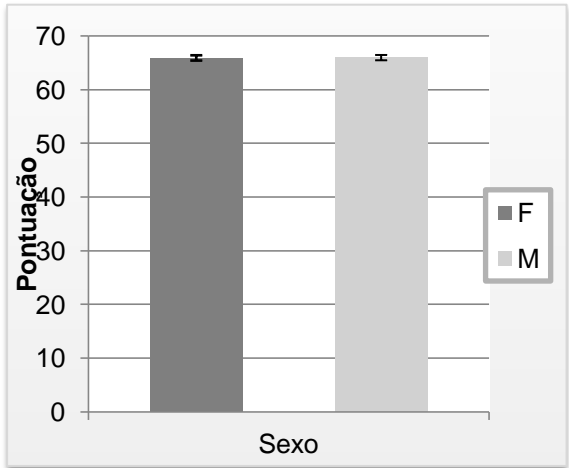
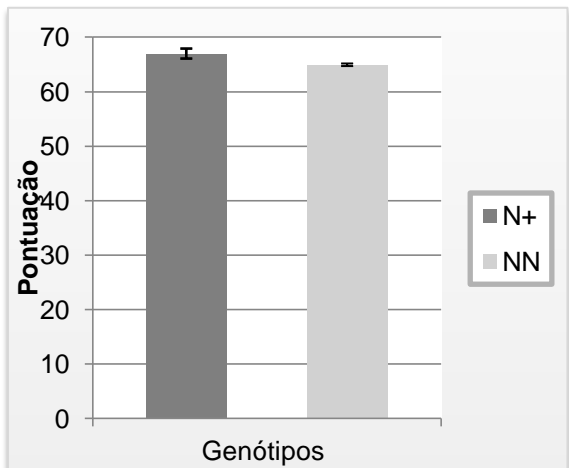


Figura 41 - Média da aptidão funcional para os genótipos da mutação nt821



## V. Conclusão

Os resultados deste estudo parecem demonstrar que a mutação F94L do gene da miostatina tem uma frequência elevada na população de bovinos da raça Limousine existente em Portugal e que o genótipo normal para esta mutação existe numa frequência muito baixa. Também foi notada uma forte relação entre a mutação nt821 e a F94L, dado que em 80% dos animais em que surgiu a mutação F94L em heterozigotia, verifica-se que também ocorre a forma heterozigótica na mutação nt821.

No que se refere à análise estatística efetuada, os resultados obtidos não permitiram concluir que as mutações F94L e nt821 influenciaram significativamente os caracteres de crescimento (PN, P120 e P210) e conformação (DM,DS, e AF) estudados, à exceção da mutação nt821 que influenciou o desenvolvimento muscular e aptidão funcional. Contudo, o estudo do efeito da mutação F94L deveria ser confirmado com base numa amostra de maiores dimensões em virtude de já ter sido citada por outros autores (Esmailzadeh *et al.*, 2008 e Casas *et al.* 2004), a influência que esta mutação pode ter nestes caracteres, bem como noutros de igual importância para a raça Limousine nomeadamente caracteres de qualidade da carne e características da carcaça.

Futuramente, pode ser colocada a hipótese de se desenvolver uma estratégia de aumento da frequência do gene selvagem da miostatina para a mutação F94L na raça bovina Limousine. Dada a dimensão mundial da raça bovina Limousine, e o número de animais existentes, não haverá certamente dificuldades de delinear estratégias para aumentar ou diminuir a frequência de determinado gene ou genótipo.

Este trabalho contribuiu para a identificação da mutação específica da raça bovina Limousine (F94L) no Laboratório de Genética Molecular da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Biotecnologias e Recursos Genéticos do INIAV - Polo de Investigação da Fonte Boa.

No âmbito das ações previstas no Programa de Melhoramento da raça bovina Limousine, a ACL prevê genotipar anualmente cerca de 200 animais para as várias mutações do gene da miostatina, pelo que este trabalho foi um ensaio de atividades a desenvolver no futuro, numa escala mais alargada e de um estudo mais amplo com base numa amostragem de maiores dimensões.

## VI. Bibliografia

- Alpha Poll South Devons. Double muscling & myostatin. Acedido em mar. 21, 2013, em: <http://www.southdevon-cattle.com.au/myostatin.htm>
- Anderson, J. H. & R. L. Willham, 1978. Weaning weight correction factors form Angus field data. *Journal of Animal Science*, 47, 124-130.
- Associação Portuguesa de Criadores da Raça Bovina Limousine, ACL (2013). Limousine no Mundo, Notícias Limousine, n.º 21, 35-39.
- Bellido, M. M., (1985). Influencia de ciertos factores ambientales sobre la productividad del ganado vacuno Retinto en la dehesa, *INIA-MAPA*, Madrid, España.
- Bellinge, R.H.S., Liberles, D.A., laschi, S.P.A., O'Brien, P.A. & Tay, G.K. (2005). Myostatin and its implications on animal breeding: A review, *Animal Genetics*, 36, 1-6.
- Carolino, N. & Veríssimo, F. (2012). Avaliação Genética da Raça Bovina Limousine: Relatório de atividades realizadas, para dar cumprimento à Acção 2.2.3 "Avaliação Genética" prevista no programa PRODER - triénio 2011-2013, *Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV)*.
- Casas, E., G. L. Bennett, T. P. Smith & L. V. Cundiff, (2004). Association of myostatin on early calf mortality, growth, and carcass composition traits in crossbred cattle. *Journal of Animal Science*, 82, 2913-1918
- Charlier, C., Coppieters, W., Farnir, F., Grobet, L., Leroy, P.L., Michaux, C., Mni, M., Schwers, A., Vanmanshoven, P., Hanset, R. & Georges, M. (1995). The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine chromosome 2, *Mammalian Genome*, 6, 788-790.
- Chelh, I., Rodriguez, J., Bonnieu, A., Cassar-Malek, I., Cottin, P., Gabillard, J.-C., Leiboitch, S., Hadj Sassi, A., Seiliez, I. & Picard, B. (2009). La myostatine: Un régulateur negative de la masse musculaire chez les vertébrés, *Inra Productions Animales*, 22 (5), 397-408.
- Cundiff, L. V., R. L. Wilham & C. A. Pratt (1966). Effects of certain factors and their two-way interactions on weaning weight in beef cattle, *Journal of Animal Science*, 25, 972-982.
- Dias Correia, J.H.R. & Dias Correia, A.A. (2006). Regulação da Miogénese, *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 2, 9-30
- Dunner, S., Miranda, M.E., Amigues, Y., Cañón, J., Georges, M., Hanset, R., Williams, J. & Ménissier, F. (2003). Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds, *Genetics Selection Evolution*, 35, 103-118.
- Esmailzadeh, A.K., Bottema, C.D.K., Sellick, G.S., Verbyla, A.P., Morris, C.A., Cullen, N.G. & Pitchford, W.S. (2008). Effects of the myostatin F94L substitution on beef traits, *Journal of Animal Science*, 86, 1038-1046.
- Federación Española de Criadores de Limusin. Raza Limusín: Información general. Acedido em jul. 11, 2013, em: [http://www.razalimusin.org/raza\\_info.html](http://www.razalimusin.org/raza_info.html)

- Ferreira, M. F. P., Bressan, M.C., Telo da Gama, L., Santos-Silva, J., Simões, J. P. C. (2012). Comparação de parâmetros quantitativos e qualitativos de carcaças e carne de bovinos da raça Preta do tipo selvagem e portadores de um alelo para a hipertrofia muscular. Acedido em nov. 15, 2013 em <http://www.racapreta.com.pt/Poster%20SPREGA2012%20final.pdf>
- Ferreira, M. F. (2006). *Polimorfismos do gene da miostatina na raça bovina preta*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agronómica. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia – Universidade técnica de lisboa
- Gama, L.T. (2002). *Melhoramento Genético Animal*. Lisboa : Escolar Editora.
- Grobet, L., Martin, L.J.R., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Menissier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R. & Georges, M. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle, *Nature Genetics*, 17, 71-74.
- Grobet, L., Poncelet, D., Royo, L.J., Brouwers, B., Pirottin, D., Michaux, C., Menissier, F., Zanotti, M., Dunner, S. & Georges, M. (1998). Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle, *Mammalian Genome*, 9, 210-213.
- Institut de L'Elevage & FBC (2012). The Breed in France. Acedido em: nov. 25, 2013, em: <http://en.france-genetique-elevage.org/Limousine,377.html>
- International Limousin Council. The history of Limousin. Acedido em jul. 11, 2013, em: <http://www.limousin-international.com/history.htm>
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P.L. & Bass, J.J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle, *Genome Research*, 7, 910-915.
- Limousine. Les Qualités de la Race Limousine. Acedido em jul. 03, 2013, em: <http://www.limousine.org>
- McPherron, A.C. & Lee, S.J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 94, 12457-12461.
- Meuwissen, T. (2003). Genomic Selection: The future of marker assisted selection and animal breeding. Merker Assisted Selection: A Fast Track to Increase Genetic Gain in Plant and Animal Breeding? Session II: MAS in Animals. Acedido em: jul. 24, 2013, em: <http://www.fao.org/biotech/Torino.htm>
- Miranda, M.E., Cañón, J., Ménissier, F., Hanset, R., Williams, J. & Dunner, S. (2002). Expresión de la hipertrofia muscular y polimorfismo del gen de la miostatina en razas bovinas de producción cárnica, *ITEA*, 98, 233-238. <http://acteon.webs.upv.es/CONGRESOS/XI%20Reunion%20MG%20PAMPLONA%202002/Docs%20XI/Miranda.pdf>
- NALF, North American Limousin Faudation. The History of Limousin. Acedido em fev. 11, 2013, em: <http://www.nalf.org/history.php>
- Pell, E. W. & W. V. Thayne (1978). Factors influencing weaning weight and grade of West Virginia beef calves, *Journal of Animal Science*, 46, 596-603.

- Polido, P.B., Ferreira, F.G., Alberton, O. & Souza, S.G.H. (2012). Marcadores moleculares aplicados no melhoramento genético de bovinos, *Arq. Cênc. Vet. Zool.*, 15(2), 161-169.
- Reggiani, C. & Kronnie, T. (1999). Hyperplasia in Exercise-Induced Muscle Growth?, *Basic Appl. Myol.* 9(6), 289-292.
- Resende, M.D.V. & Perez, J.R.H.R. (1999). Melhoramento animal: Predição de valores genéticos pelo modelo animal - BLUP em bovinos de leite, bovinos de corte, ovinos e suínos, *Arch. Vet. Scienc.*, 4(1), 17-29.
- Resende, M.D.V., Lopes, P.S., Silva, R.L. & Pires, I.E. (2008). Seleção genómica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético, *Pesquisa Florestal Brasileira*, 56, 63-77
- The British Limousin Cattle Society (2011). *Superior Beef Production Pinpointed Through Gene Discovery*. Acedido em mai 22, 2013 em <http://limousin.co.uk/category/f94l-profit-gene/>
- Williams, J. H., D. C. Anderson & D. D. Kress (1979). Milk production in Hereford cattle, *Journal of Animal Science*, 49, 1443-1448.
- Yang, W., Kang, X., Yang, Q., Lin, Y. & Fang, M. (2013). Review on the developmente of genotyping methods for assessing farm animal diversity, *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4:2, 1-6.







A realização deste trabalho foi apoiada por:

